

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Charakterisierung der Aktivierung von NFκB in verschiedenen
Melanomzellen und Hemmung von NFκB mit Oligonukleotiden
als potentielle Tumorthherapie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Irene Hübert
aus St. Petersburg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Berking

Mitberichterstatter: PD Dr. C. Bourquin
PD Dr. A. Faußner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. hum. biol. R. Besch

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2010

ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... 5**TABELLENVERZEICHNIS 7****EINLEITUNG..... 8**

1	Das maligne Melanom.....	8
1.1	Definition des malignen Melanoms.....	8
1.2	Inzidenz des malignen Melanoms	8
1.3	Risikofaktoren für die Melanomentstehung.....	9
1.4	Klassifikation des malignen Melanoms	9
1.5	Pathogenese des malignen Melanoms.....	10
1.6	Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung	12
1.6.1	Wachstumsfaktoren und Zytokine	13
1.6.2	Chemokine	13
1.6.3	Proteinasen	14
1.6.4	Adhäsionsmoleküle im Melanom.....	15
1.6.4.1	Integrine.....	16
1.6.4.2	Immunoglobulin-Familie	16
1.6.4.3	Cadherine	16
1.6.5	Wichtige Signalwege im malignen Melanom.....	17
1.6.5.1	Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg	17
1.6.5.2	PI3K/Akt-Signalweg.....	18
2	Transkriptionsfaktoren im malignen Melanom	19
2.1	Allgemeine Grundlagen der transkriptionellen Genregulation	19
2.2	Der Transkriptionsfaktor NFκB	20
2.2.1	Struktur von NFκB	21
2.2.2	Aktivierung von NFκB	22
2.2.3	Regulation von NFκB.....	24
2.2.4	Signalwege der NFκB-Aktivierung.....	24
2.2.5	Wirkung von NFκB.....	25
2.2.6	Rolle von NFκB im Immunsystem und bei Entzündungen	26
2.2.7	NFκB in Tumoren	29

MATERIAL UND METHODEN..... 34

1	Materialien.....	34
1.1	Chemikalien	34
1.2	Radioaktive Chemikalien.....	34
1.3	Enzyme.....	34

1.4	Biologisches Material	35
1.4.1	Humane Melanomzellen.....	35
1.4.2	Humane Melanozyten.....	36
1.5	Materialien für die Zellkultur	36
1.6	Zellkulturmedien, Medienzusätze, Puffer und Lösungen	37
1.7	Antikörper.....	39
1.8	Oligonukleotide	39
1.8.1	Decoy-Oligonukleotide mit NFκB-Bindungsmotiv	40
1.8.2	Kontroll-Decoy-Oligonukleotide	40
1.8.3	Si-RNA.....	40
1.8.4	Primer und Sonden für die Echtzeit-PCR.....	41
1.8.4.1	Primer für die SYBR Green I basierte Echtzeit-PCR	41
1.8.4.2	Primer und Sonden für die Sonden-basierte Echtzeit-PCR	41
1.9	Materialien für Transfektionsversuche	42
1.10	Materialien für ELISA	42
1.11	Materialien für Western-Blot.....	42
1.12	Materialien für die indirekte Immunfluoreszenz.....	43
1.13	Materialien für die Reverse Transkription	43
1.14	Kommerzielle Komplettsysteme	43
1.15	Einwegartikel.....	44
1.16	Geräte.....	44
1.17	Software.....	45
2	Methoden	46
2.1	Molekularbiologische Methoden	46
2.1.1	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	46
2.1.1.1	Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide.....	47
2.1.1.2	Herstellung der DNA-Sonden für Gelretardations-Assays	48
2.1.1.3	Durchführung der Gelretardations-Experimente	48
2.1.1.4	Supershift-Experimente	49
2.2	Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren	50
2.2.1	DNA-Aufreinigung durch Phenolextraktion und DNA-Fällung für Stabilitätsuntersuchungen	50
2.2.2	RNA-Isolation mit Trizol.....	51
2.2.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	51
2.2.4	Synthese der cDNA durch Reverse Transkription	52
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	52
2.2.5.1	Allgemeines Prinzip der PCR.....	52
2.2.5.2	Quantitative Echtzeit-PCR.....	53
2.3	Proteinchemische Methoden	58

2.3.1	Bestimmung der Konzentration von Gesamtzell- und Kernproteinen	58
2.3.2	Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA)	58
2.3.3	Western-Blot-Analysen	59
2.4	Zellbiologische Methoden	60
2.4.1	Kultivierung von humanen Melanomzellen und Melanozyten	60
2.4.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen	61
2.4.3	Isolierung von Proteinen	61
2.4.4	Isolierung von Zellkernproteinen	61
2.4.5	Transfektion von Oligonukleotiden	62
2.4.5.1	Transfektion mit Oligofectamine	62
2.4.5.2	Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX	63
2.4.6	Immunfluoreszenzanalysen	64
2.4.7	Matrigel Invasions-Assay	64
2.5	Statistische Analysen	66
ZIELSETZUNG		67
ERGEBNISSE		68
1	Charakterisierung der NF κ B-Aktivierung	68
1.1	Analyse der NF κ B-Aktivierung über EMSA	68
1.2	Identifikation der NF κ B-Untereinheiten	69
1.3	Analyse der NF κ B-Aktivierung über ELISA	71
2	Inhibition von NF κ B für funktionelle Analysen	73
2.1	Etablierung der Transfektionsbedingungen für Decoy-Oligonukleotide	73
2.2	Stabilitätsuntersuchungen der Decoy-Oligonukleotide	75
2.3	Effektivität der Inhibition von NF κ B mit Decoy-Oligonukleotiden	76
2.4	Inhibition von NF κ B über RNA-Interferenz	78
2.4.1	Hemmung der p65-Untereinheit mittels siRNA auf mRNA-Ebene	78
2.4.2	Hemmung der p65-Untereinheit auf Protein-Ebene	79
2.4.3	Expression von NF κ B-Zielgenen nach Inhibition der p65-Untereinheit	80
2.4.3.1	IL-8-Expression	80
2.4.3.2	IL-1 β -Expression	82
3	Biologische Aktivität von NF κ B	83
3.1	Analysen von Apoptose und Zellproliferation	83
3.2	Invasionsanalysen	84
DISKUSSION		86
1	Charakterisierung der NF κ B-Aktivierung	86
1.1	Charakterisierung der NF κ B-Aktivierung über EMSA	86

1.2	Charakterisierung der NFκB-Aktivierung über ELISA	88
2	NFκB-Inhibition	90
2.1	Hemmung von NFκB mittels Decoy-Oligonukleotiden	90
2.2	Hemmung von NFκB mittels siRNA.....	90
2.2.1	Effizienz der p65-Inhibition auf mRNA- und Protein-Ebene	90
2.2.2	Inhibition von NFκB-Zielgenen mittels siRNA.....	91
2.2.3	Regulation der IL-8-Expression durch NFκB im malignen Melanom	92
3	NFκB-Funktionsanalysen	93
3.1	Untersuchungen zur Apoptose und Proliferation	93
3.2	Invasionsanalysen.....	94
4	Klinische Bedeutung und Ausblick.....	95
ZUSAMMENFASSUNG		97
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME		111
DANKSAGUNG		115

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Das 5-Stufen-Modell nach Clark et al. ¹⁴	11
Abb. 2:	Ras/ Raf/ MEK/ ERK- und PI3K/ PKB/ Akt-Signalwege.	18
Abb. 3:	Die Rel/NFκB-Proteinfamilie.	21
Abb. 4:	Schematische Darstellung der NFκB-Aktivierung	23
Abb. 5:	Schematische Darstellung des klassischen und des alternativen Signalweges der NFκB-Aktivierung.	25
Abb. 6:	Rolle von NFκB bei der Immunantwort und Entzündungsreaktionen	27
Abb. 7:	NFκB-Aktivierung, Interaktion zwischen Entzündungszellen und maligne transformierten Zellen und Mechanismen, durch welche dauerhaft aktiviertes NFκB die Tumorentwicklung und –progression fördert.	30
Abb. 8:	Genmutationen im malignen Melanom und NFκB-Aktivierung	32
Abb. 9:	Schematische Darstellung des Gelretardationsexperimentes	47
Abb. 10:	Schematische Darstellung der eingesetzten Sonden-PCR	57
Abb. 11:	Schematische Darstellung des Matrigel Invasionsassays	65
Abb. 12:	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	68
Abb. 13:	Supershift und Kompetitionsanalysen mit Nuklearextrakten aus den Melanomzelllinien WM793 (invasiv) und WM9 (metastatisch)	70
Abb. 14:	DNA-Bindungsaktivität von p50 in Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstadien versus Melanozyten.....	71
Abb. 15:	DNA-Bindungsaktivität von p65 in Melanomzellen unterschiedlicher Progressionsstadien versus Melanozyten.....	72
Abb. 16:	Aufnahme von Decoy-Oligonukleotiden in 1205Lu Melanomzellen in der Fluoreszenzmikroskopie (200- und 500- fache Vergrößerung)	74
Abb. 17:	Stabilitätsanalyse der in die Zellen aufgenommenen dsDecoy-ODNs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion	75
Abb. 18:	Wirkung von NFκB-Decoy-Oligonukleotiden auf die Expression des NFκB-Zielgens IL-8 in Melanomzellen	76
Abb. 19:	Wirkung Phosphorothioat (PTO) -modifizierter Decoy-Oligonukleotide auf IL-8-Expression in Melanomzellen.....	77
Abb. 20:	p65 mRNA-Expression 48 h nach Transfektion mit p65 siRNA.....	78
Abb. 21:	p65 mRNA-Expression 6 Tage nach zweimaliger Transfektion mit p65 siRNA.....	79
Abb. 22:	Analyse der p65-Protein-Expression in Melanomzellen über Western-Blot 3 Tage und 6 Tage nach Transfektion mit p65 siRNA	80

Abb. 23: RT-PCR-Analysen der IL-8-Expression in 1205Lu Melanomzellen 6 Tage nach Transfektion mit p65 siRNA	81
Abb. 24: IL-1 β mRNA-Expression in 1205Lu-Melanomzellen 6 Tage nach Transfektion mit p65 siRNA.....	82
Abb. 25: Invasionsverhalten der metastatischen Melanomzelllinie 1205Lu durch ein Matrigel nach 72 Stunden.....	84
Abb. 26: Auswertung des Invasions-Assays	85
Abb. 27: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse	86

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	NFκB-Aktivierung in Entzündungserkrankungen.....	28
Tab. 2:	Dauerhafte NFκB-Aktivierung in humanen Zelllinien.....	31
Tab. 3:	Aufstellung der verwendeten humanen Melanomzelllinien	36
Tab. 4:	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.....	39
Tab. 5:	Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten NFκB-Decoy- Oligonukleotide	40
Tab. 6:	Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Kontroll-Decoy- Oligonukleotide	40
Tab. 7:	Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten siRNA	40
Tab. 8:	Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer für SYBR Green I PCR	41
Tab. 9:	Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer und Sonden für die Sonden-PCR	41
Tab. 10:	PCR-Protokoll SYBR Green I (exemplarisch für das HPRT-Gen).....	55
Tab. 11:	PCR-Protokoll der Sonden-PCR.....	58
Tab. 12:	Übersicht über die bisher bezüglich der NFκB-Aktivität analysierten Melanomzelllinien	88

EINLEITUNG

1 Das maligne Melanom

1.1 Definition des malignen Melanoms

Das maligne Melanom ist ein Hauttumor, der aus pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten, hervorgeht. Es manifestiert sich überwiegend in der Haut, kommt jedoch auch am Auge (Bindehaut, Iris, Ziliarkörper, Aderhaut), an den Hirnhäuten und an Schleimhäuten verschiedener Lokalisation vor. Die meisten Melanome setzen ihre Pigmentbildung fort, so dass der Tumor an seiner schwarzen, unregelmäßigen Oberfläche auf der Haut auffällt. Es treten jedoch auch amelanotische Formen auf. Im Vergleich zur Tumormasse besteht beim Melanom eine frühe Tendenz zur Metastasierung und damit eine ungünstige Prognose, so dass das maligne Melanom für etwa 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich ist.¹

1.2 Inzidenz des malignen Melanoms

Schätzungen der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) mit der Datenbank Globocan 2002 zufolge, kommt es jährlich weltweit zu ca. 160.000 neuen Melanomerkkrankungen.² In Deutschland erkranken jährlich etwa 14.900 Menschen an einem malignen Melanom der Haut, darunter ca. 8.400 Frauen und ca. 6.500 Männer.³ Damit macht diese Tumorart in Deutschland etwa 3% (Frauen 4,1%, Männer 2,8%) aller malignen Neoplasien (ohne Berücksichtigung der nichtmelanozytären Hauttumoren) aus und verursacht ca. 1% der Krebstodesfälle.³ Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei vergleichsweise niedrigen 63 Jahren bei Männern und bei etwa 57 Jahren bei Frauen. Relevante Erkrankungsdaten treten bereits ab dem 20. Lebensjahr auf.³

Im europäischen Vergleich liegen die Erkrankungsdaten am malignen Melanom in Deutschland an dritter beziehungsweise vierter Stelle für Männer beziehungsweise Frauen. Innerhalb Europas aber auch in Deutschland zeichnet sich ein Nord-Süd-Gefälle ab mit höheren Inzidenzen im Norden.⁴ Deutlich niedrigere Erkrankungsdaten weisen die Mittelmeerländer mit einer überwiegend dunkelhäutigen Bevölkerung und einem traditionell anderen Sonnenverhalten auf. Die höchsten Inzidenzraten weltweit werden aus Australien/ Neuseeland mit 37,7 (Männer) beziehungsweise 29,4 (Frauen) Diagnosen pro 100.000 und Jahr gemeldet. Die niedrigsten Raten treten in Ländern Asiens und Afrikas auf und damit in Regionen mit überwiegend nicht-weißhäutiger Bevölkerung.²

Die Häufigkeit des diagnostizierten malignen Melanoms ist in den letzten 30 Jahren stark angestiegen. Seit den 1980er Jahren haben sich die Erkrankungsraten mehr als verdreifacht.³ Bei der Mortalität hingegen war seit den 1970er Jahren keine wesentlichen Veränderungen festzustellen. Sowohl die erhöhte Aufklärung der Bevölkerung als auch die Sensibilisierung der Ärzteschaft könnten die Ursache dafür sein, dass in den letzten Jahren maligne Melanome in früheren und damit prognostisch günstigeren Stadien häufiger diagnostiziert wurden.

1.3 Risikofaktoren für die Melanomentstehung

Die Risikofaktoren für das maligne Melanom lassen sich nach dem aktuellen Kenntnisstand in konstitutionelle Risikofaktoren und Risikofaktoren aus der Umwelt gliedern.⁵ Zu den konstitutionellen Risikofaktoren gehören ein heller Hauttyp mit Sonnenbrandempfindlichkeit, die Neigung zu Sommersprossen sowie das Aufweisen einer grossen Anzahl erworbener (kongenital) und dysplastischer Nävuszellnävi.⁶ Ein weiterer entscheidender Risikofaktor ist das Auftreten von Melanomen in der Familie. Die Tatsache, dass etwa 10% aller Melanome familiär gehäuft auftreten (Syndrom der dysplastischen Nävi), die in bis zu 30% auf Mutationen unter anderem im p16/CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)⁷ –Gen zurückgeführt werden,^{8, 9} unterstreicht die herausragende Bedeutung der genetischen Komponente bei der Melanomentstehung. Als wichtigster Melanom-Risikofaktor der Umwelt gilt die ultraviolette (UV-)Strahlung. Hierbei scheint eine intensive, akut-intermittierende Sonnenexposition eine bedeutende Rolle zu spielen. Dies erklärt das vermehrte Auftreten des malignen Melanoms nach häufigen Sonnenbränden, insbesondere im Kindesalter.¹⁰ Dabei wird für das maligne Melanom insbesondere die energieärmere, bis in die Dermis eindringende UVA (320-400 nm) verantwortlich gemacht, die indirekt über reaktive Sauerstoffspezies DNA-Schäden verursacht.⁵

1.4 Klassifikation des malignen Melanoms

Klinisch und histopathologisch lassen sich vier verschiedene Melanomtypen unterscheiden. Die am häufigsten vorkommende Form ist das superfiziell spreitende Melanom (SSM; Häufigkeit: 75%¹¹). Das SSM beginnt mit einer intraepidermalen horizontalen Ausbreitungsphase und imponiert zunächst als Fleck, entwickelt sich dann invasiv flach erhaben, häufig mit farblicher Vielfalt, hellen Regressionszonen und sekundär knotigen Anteilen.¹² Am häufigsten kommt das SSM am Rücken, an der Brust und an den Extremitäten vor. Betroffen sind meistens Menschen ab dem 50. Lebensjahr. Wird das SSM früh, also mit geringer Tumordicke erkannt, bestehen gute Heilungschancen.

Das knotige (primär noduläre) Melanom (NM; Häufigkeit: 15%¹¹) entsteht wie das SSM in gesunder Haut oder geht aus einem Nävuszellnävus hervor. Es imponiert als primär knotiger, überwiegend schwarzbrauner, häufig erosiv-blutiger Tumor, der praktisch ausschließlich von einer vertikalen Wachstumsphase geprägt ist.¹² Das NM tritt bevorzugt am Rücken, auf der Brust sowie an den Extremitäten auf. Das Alter der Betroffenen liegt durchschnittlich bei 55 Jahren. Ein weiterer Melanomtyp ist das Lentigo-maligna-Melanom (LMM). Die Vorstufe hiervon ist die Lentigo maligna (In-situ-Melanom). Sie entsteht infolge einer chronischen UV-Lichtexposition und tritt nahezu ausschließlich im Gesichtsbereich älterer Patienten auf. Die Lentigo maligna ist charakterisiert durch einen flachen, unregelmäßig gefärbten, braun bis schwarz pigmentierten Flecken. Sie kann Jahre bis Jahrzehnte bestehen und schließlich in eine bösartige Wachstumsform übergehen, das LMM (Häufigkeit: 5%¹¹). Der bei dunkelhäutigen Bevölkerungsgruppen am häufigsten auftretende Melanom-Typ ist das akrolentiginöse Melanom (ALM; Häufigkeit: 5%¹¹). „Akren“ steht dabei für Körperenden, vor allem die Enden der Gliedmaßen (i.e.S. Finger- und Zehenendglieder). Das ALM tritt vorwiegend an den Phalangen, Handinnenflächen und Fußsohlen oder subungual auf und wird aufgrund dieser diagnostisch häufig unzugänglichen Lokalisation und des nicht immer typischen klinischen Erscheinungsbildes oft erst spät erkannt.¹³

Einige weitere Typen des malignen Melanoms sind nicht klassifizierbar oder repräsentieren Mischformen. Diese machen etwa 5% aller Melanome aus. Zu klinischen Sonderformen zählen beispielsweise amelanotische Melanome, sowie Schleimhaut- oder andere extrakutane Melanome.

1.5 Pathogenese des malignen Melanoms

Die Initiation und Progression des malignen Melanoms wurde erstmals anhand von histopathologischen Veränderungen an einem 5-Stufen-Modell von **Clark et al.**¹⁴ beschrieben:

(1) Der ersten Stufe des Clark Modells entspricht der angeborene (kongenitale), benigne Nävus, welcher durch Proliferation von strukturell normalen Melanozyten gebildet wird. Histologisch lassen sich dabei Nester von Melanozyten entlang der Basalmembran erkennen. (2) Es folgt das Stadium des dysplastischen (atypischen) Nävus. Dieser kann entweder aus einem benignen Nävus oder auf bis dahin unauffälliger Haut entstehen. Histopathologische Kriterien eines dysplastischen Nävus sind neben Zellasymmetrie, Polymorphie und nukleärer Atypien, ein vermehrtes Auftreten von Mitosen sowie eine abnormale, intraepidermale Proliferation melanozytärer Zellen.¹⁵ (3) Den nächsten Schritt bildet die radiale Wachstumsphase (*radial growth phase*, RGP). In diesem Stadium breiten sich die transformierten Melanozyten in horizontaler Richtung aus. Ihre Proliferation bleibt jedoch in situ auf die

Epidermis beschränkt. (4) Dieser Phase folgt die vertikale Wachstumsphase (*vertical growth phase*, VGP), bei welcher eine Ausdehnung der transformierten Melanozyten in die Dermis erfolgt. Die Progression des primären Melanoms von RGP in VGP geht mit einer dramatischen Reduktion der Therapieoptionen, sowie der Heilungs- und Überlebensraten einher. (5) Auf der letzten Stufe der Melanomentwicklung steht das metastasierende Melanom, welches das Potential erlangt hat, sich sowohl auf dem Blut- als auch auf dem Lymphweg im Körper zu verbreiten.



Abb. 1: Das 5-Stufen-Modell nach Clark et al.¹⁴

Das Modell nach Clark et al. impliziert, dass das Melanom in der Regel vom benignen Naevus ausgehend, in einer Sequenz von mehreren Transformationsschritten entsteht. Allerdings entwickeln sich nur etwa 35% aller Melanome aus Naevi. Ansonsten kann sich das Melanom auch direkt aus Melanozyten entwickeln. Verändert nach Herlyn et al., 1998.¹⁶

Einer der wichtigsten prognostischen Faktoren primärer Melanome richtet sich dabei nach der Eindringtiefe, welche in den Klassifikationen nach Clark¹⁴ (Eindringtiefe relativ zu anatomischen Strukturen = relative Eindringtiefe) beziehungsweise nach Breslow¹⁷ (Tumordicke relativ zum Stratum granulosum (=oberste Schicht der Epidermis) = absolute Eindringtiefe) berücksichtigt wird. Bei einer Eindringtiefe von weniger als 1 mm liegt die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) zwischen 91 und 95%. Diese nimmt mit zunehmender Tumordicke ab. Bei einer Tumordicke größer als 4 mm liegt sie zwischen 58% und 59%. Das Vorhandensein einer histologisch erkennbaren Ulzeration verschlechtert die Überlebensrate dabei erheblich.¹⁸ Eine kurative Behandlung durch operatives Entfernen des Melanoms ist vor allem bei frühen Stadien des Primärtumors (Primarius) mit einer geringen Tumordicke gut möglich. Fortgeschrittene Tumore hingegen zeigen sich gegenüber konventioneller Chemo- oder Radiotherapie als sehr resistent. Bei vorliegenden Lymphknotenmetastasen unterliegt die 5-JÜR einer größeren Variation. Liegt eine einzige Mikrometastase des regionalen Lymphknotens vor und ein nichtulzerierter Primarius, so beträgt die 5-JÜR etwa 67%. Bei einem ulzerierten Primarius und 2-3 Makrometastasen in den regionären Lymphknoten liegt diese nun mehr bei 24%. Entscheidend für die Prognose im Stadium IV ist neben der Fernmetastasengröße und -anzahl, die Art des Organbefalls sowie der LDH-Serumwert.¹⁸ Hierbei sinkt die 5-JÜR auf < 9%. Selten wurde über spontane

Remissionen des malignen Melanoms, selbst im metastasierten Erkrankungsstadium, berichtet.¹⁹

1.6 Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung

Neuere Studien haben gezeigt, dass die histologischen Veränderungen, die während der Melanomentstehung oder -progression auftreten, mit einer Reihe von genetischen Veränderungen, welche im Verlauf sequentiell akkumulieren, assoziiert sind.²⁰ (zur Übersicht ²¹). Ein Teil der genetischen Veränderungen kann dabei bereits in den Keimzellen vorliegen, wodurch sich die häufig zu beobachtenden familiären Häufungen des Melanoms erklären lassen.⁷ Etwa 10% aller Melanome treten familiär bedingt auf. Andere spezifische Genmutationen werden dagegen eher mit der Entstehung von sporadisch auftretenden Melanomen in Zusammenhang gebracht.²²⁻²⁵

Welche Gene dabei verändert sind, wird deutlich, wenn verschiedene Aspekte der Tumorentwicklung zunächst einzeln betrachtet werden. Unkontrollierte **Proliferation** und **Überleben** können auf Defekte in der Reaktion auf **Wachstumsfaktoren und Zytokine** zurückzuführen sein, was zu einem autonomen und von exogenen Stimuli unabhängigen Zellwachstum führt und/ oder die Zelle gegenüber pro-apoptotischen Stimuli unempfindlich macht. Veränderte **Signaltransduktionen** als Folge von fehlerhaften Produkten diverser Gene und/ oder eine deregulierte Aktivität von **Transkriptionsfaktoren** können ebenfalls eine ungehemmte Proliferation oder vermehrtes Überleben der Zellen bedingen. Bei Genmutationen können solche, die mit der Expression von **Onkogenen** (*gain of function mutations*; Gene, die bei einer Fehlfunktion das maligne Zellwachstum stimulieren können) oder aber der Inaktivierung von **Tumorsuppressorgenen** (*loss of function mutations*; Gene, die bei intakter Funktion das maligne Wachstum von Zellen unterdrücken) einhergehen, unterschieden werden.^{25, 26}

Damit es schließlich zur **Metastasierung** der Melanomzellen kommt, müssen weitere Faktoren, die bei der Migration von Zellen, dem Adhäsionsverhalten und der Invasion (Matrixdegradation) von Bedeutung sind, ebenfalls verändert sein.

Im Folgenden wird auf einige wichtige Aspekte der Melanomentstehung und -progression näher eingegangen. Diese umfassen **äußere Faktoren** (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine), die die Melanomzellen beeinflussen, **Signalwege**, die äußere Reize weiterleiten, sowie veränderte **Zelladhäsionseigenschaften und Matrixdegradation** durch Proteasen als Voraussetzung für Invasion und Metastasierung der entarteten Zellen.

1.6.1 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Melanomzellen sezernieren viele Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche über autokrine und parakrine Wirkung eine autonome Kontrolle ihres Wachstums und Proliferation verursachen. Für die Entfaltung der Wirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die sich im Tumormilieu befinden, exprimieren Melanomzellen wiederum Wachstums- und Zytokin-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche.²⁷ Melanomzellen können auch auf Faktoren reagieren, die von Nachbarzellen sezerniert werden.

Zu den autokrinen Wachstumsfaktoren zählen unter anderem bFGF (*basic fibroblast growth factor*), MGSA/GRO (*melanoma growth stimulatory activity/ growth regulated protein*), IL-8 (Interleukin-8), IL-6, IL-10 und PDGF (*platelet derived growth factor*)-A und -B.²⁸ Parakrine Wachstumsfaktoren und Zytokine sind PDGF, EGF (*epidermal growth factor*), TGF (*transforming growth factor*) - α , TGF- β , IL-1 sowie VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Diese wirken stimulierend auf die Umgebungszellen der Melanomzellen, wie beispielsweise auf Endothelzellen, Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten und Fibroblasten und regen diese zur Produktion weiterer tumorrelevanter Faktoren an.²⁹ Zu den biologischen Auswirkungen der parakrinen Wachstumsfaktoren zählen ferner Angiogenese, Stromaumbau, Aktivierung proteolytischer Enzyme sowie Veränderung der Immunantwort. Einige Wachstumsfaktoren, die zunächst eine inhibierende Funktion auf Melanozyten ausüben, können später in entarteten Melanomzellen schließlich eine wachstumsstimulierende Funktion erlangen. Zu diesen Faktoren gehören IL-1, IL-6, TGF- β und Interferon.

1.6.2 Chemokine

Chemokine gehören zu einer Gruppe kleiner, chemotaktischer Proteine mit einem Molekulargewicht von 8-11 kDa, welche entsprechend der Lokalisation ihrer Cystein-Reste am N-Terminus in 4 Familien gegliedert werden: C-, CC-, CXC- und CX₃C-Familie.³⁰ Die CC- und CXC-Familien repräsentieren dabei die Mehrzahl derzeit bekannter Chemokine. Die Rezeptoren, an die Chemokine binden, gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Chemokine waren zunächst für ihre Funktion bekannt, über einen gesteigerten zytoskeletalen Umbau eine gerichtete Migration (Chemotaxis) von Neutrophilen auszulösen. Damit wurde ihnen eine wichtige Rolle bei Immun- und Entzündungsreaktionen zugeschrieben.³¹ Weitere Studien haben gezeigt, dass Chemokine durch Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren und nachfolgende Transduktion des Signals über diverse Signalkaskaden ins Zellinnere und durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren auch wichtige Prozesse bei der Entstehung und Metastasierung von Tumoren, unter anderem auch beim

malignen Melanom, beeinflussen können.³²⁻³⁴ Zu den bisher untersuchten Wirkungen der Chemokine am Melanom gehören neben melanozytärer Transformation³⁵ und Wachstumsförderung³⁶, die Förderung der Resistenz gegenüber Apoptose³⁷ sowie die Hemmung der natürlichen Anti-Tumor- Immunabwehr³⁷. Weiterhin fördern Chemokine die Gefäßeinsprossung (Angiogenese) ins Tumorgewebe, (zur Übersicht ³⁸), ein Prozess, von dem Tumoren hinsichtlich ihres Wachstums, Überlebens, der Invasion und Metastasierung stark abhängen.

Eines der bisher am intensivsten untersuchten Chemokine ist das Interleukin-8 (IL-8/CXCL8). IL-8 wurde erstmals 1987 nach Aufreinigung aus dem Überstand LPS-stimulierter humaner Monozyten als chemotaktischer Faktor für Neutrophile beschrieben³⁹. Dieses wird von leukozytären und nicht-leukozytären Zellen, darunter Endothelzellen⁴⁰ gebildet. Da das Endothel an der Gefäß-/ Gewebe-Grenze die Extravasation leukozytärer Zellen vermittelt, kommt der endothelialen Expression von IL-8 besondere Bedeutung zu.

Diverse neuere Studien haben gezeigt, dass IL-8 beim Melanom invasiver (VGP) und metastatischer Wachstumsstadien häufig dauerhaft exprimiert wird⁴¹ und eine Reihe von verschiedenen Funktionen ausübt.⁴² So stimuliert IL-8 im Melanom neben Wachstum^{43, 44} und Proliferation⁴⁵ die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen⁴⁶ und durch die Induktion der Chemotaxis von Endothelzellen auch die Angiogenese.^{44, 47} Die Induktion der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) durch IL-8, welche den Abbau der extrazellulären Matrix bewirkt (siehe unten) und damit Zellmigration und -invasion fördert, führt zu einer weiteren Steigerung des metastatischen Potentials in Melanomzellen^{44, 48} und ist ferner mit der Progression von der radiären in die vertikale Wachstumsphase assoziiert.⁴⁹

Die Expression von IL-8/ CXCL8 steht unter der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren Nukleärer Faktor-kappaB (NFκB), CCAAT-Verstärker bindendes Protein-β (C/ EBP-β) und Aktivatorprotein-1 (AP-1).⁵⁰

1.6.3 Proteinasen

Die Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) spielt in einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen so z.B. im Rahmen des Gewebsumbaus und der Zellmigration, aber auch bei der Tumorzellinvasion bis hin zur Metastasierung eine entscheidende Rolle.⁵¹ Die bekanntesten Vertreter, die an diesem Prozess maßgeblich beteiligt sind, sind Proteasen des Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA)-Systems und die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).

uPA wird als inaktive Vorstufe sezerniert und durch Bindung an seinen spezifischen Rezeptor (uPAR) auf uPAR-exprimierenden Zellen aktiviert. In seiner aktiven Form bindet uPA Plasminogen und überführt dieses in seinen aktive Form, das Plasmin.

Plasmin degradiert die ECM dann entweder direkt oder über die Aktivierung von MMPs.⁵² Auf diese Weise erleichtert es die Migration und die Extravasation, sowie den Prozess der metastatischen Absiedlung von Tumorzellen. uPA wird im Melanom unter anderem durch Zytokine wie IFN- γ oder TNF- α reguliert.⁵³ Ein weiterer wichtiger Induktor von uPA im Melanom ist der Transkriptionsfaktor NF κ B (siehe unten).⁵⁴

MMPs spielen auch bei der physiologischen Degradation der ECM eine wichtige Rolle. Sie bilden eine große Familie von Endopeptidasen, die derzeit ca. 22 Mitglieder umfasst und in fünf Untergruppen unterteilt wird. Die 1. Gruppe besteht aus interstitiellen Kollagenasen. Dazu zählen unter anderem MMP-1, MMP-8 und MMP-13. Die 2. Gruppe umfasst Gelatinasen MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B), welche insbesondere Kollagen, Gelatin und Elastin der Basalmembran abbauen können. Stromelysine, zu welchen MMP-3, MMP-10 und MMP-11 gehören, bilden die 3. Gruppe. Die 4. Gruppe enthält MMPs vom Membran-Typ (MT-MMPs), die eine transmembrane Domäne enthalten und ebenfalls die ECM abbauen können. Weiterhin existiert eine 5. Gruppe von MMPs, die sich keiner der vorangegangenen Gruppen zuordnen lassen. Dazu zählen MMP-19, MMP-20 und MMP-23.

Im Melanom werden hauptsächlich MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13 und MT1-MMP exprimiert.⁵⁵ Ihre erhöhte Sekretion durch Melanomzellen, durch umgebende Fibroblasten⁵⁶ oder durch tumorassoziierte Makrophagen (TAMs)⁵⁷, ist mit einer erhöhten Metastasierungstendenz von Melanomzellen sowie einer schlechteren Prognose assoziiert.⁵⁸

Zu den Faktoren, die die Expression von MMP-Genen regulieren, zählen neben Wachstumsfaktoren, Hormonen und Interleukinen wie IL-1, IL-6 sowie TNF- α , auch der Transkriptionsfaktor NF κ B.⁵⁹

1.6.4 Adhäsionsmoleküle im Melanom

Am Beginn des Metastasierungsprozesses steht eine Veränderung der Adhäsion von Tumorzellen, welche ihre Interaktion mit der ECM und den Nachbarzellen betrifft. Hier übernehmen Adhäsionsmoleküle (sog. *cellular adhesion molecules*; CAMs) eine Schlüsselfunktion. Veränderungen im CAM-Profil gehen oft mit einer veränderten Zell-Zell-Interaktion und einem Wechsel zu neuen Interaktionen einher - zwei Schritte, die sich auch am Beginn eines jeden Metastasierungsprozesses finden. Die Mehrzahl der Adhäsionsmoleküle gehört einer der drei Genfamilien an: Integrine, Immunglobulin-Familie und Cadherine. Einzelne Mitglieder aus jeder dieser Familien sind bislang wiederholt mit der Melanommetastasierung in Zusammenhang gebracht worden. Diese werden im Folgenden exemplarisch vorgestellt.

1.6.4.1 Integrine

Integrine gehören zur Gruppe der Membranproteine. Sie vermitteln Kontakte zwischen den Zellen und der ECM, indem sie kurze Peptidsequenzen der ECM-Komponenten wie Fibronektin, Laminin und Kollagen erkennen und an diese binden.⁶⁰ Intrazellulär sind Integrine an Aktinfilamente gekoppelt. Damit haben sie die Möglichkeit der Einflussnahme auf Umbauprozesse des Zytoskeletts, was wiederum Voraussetzung für die Migration einer Zelle ist. Fokale Adhäsionskontakte der Zelle, die über Integrine stattfinden, beeinflussen aber auch über Aktivierung bestimmter intrazellulärer Signalwege, wie z.B. des Ras-Raf-MAPK-ERK-Signalweges, Proliferation und Überleben beziehungsweise Apoptose einer Zelle.⁶¹

1.6.4.2 Immunglobulin-Familie

Die Immunglobulin-Familie ist eine weitere Gruppe an Transmembran-Glykoproteinen, zu der Zelladhäsions-Moleküle wie z.B. ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*), ELAM-1 (*endothelial-leukocyte adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und Mel-CAM/ MUC18 (*melanocytic cell adhesion molecule*) zählen.

Eines der bisher sehr gut untersuchten CAMs im kutanen Melanom ist Mel-CAM (zur Übersicht⁶²). Neben seiner Funktion als Adhäsionsmolekül ist es auch an diversen intrazellulären Signalwegen beteiligt. Während Mel-CAM kaum in benignen Nävi vorkommt, steigt seine Expression in Primärmelanomen mit zunehmender Tumordicke⁶³ und wird in über 80% der metastatischen Läsionen exprimiert.⁶⁴ Eine Reihe von Studien haben bisher gezeigt, dass Mel-CAM/ MUC18 in Melanomzellen neben Wachstum und Proliferation⁶⁵ auch die Invasion und Metastasierung unter anderem über die Induktion von MMP-2 fördert.^{66, 67}

1.6.4.3 Cadherine

Ein wichtiges Beispiel für eine Gruppe von Zellmembranmolekülen, die für den Zusammenhalt zwischen Zellen sorgt, ist die Superfamilie der Cadherine. Als Transmembran-Glykoproteine stellen sie den Kontakt zwischen zwei Zellen durch eine Ca^{2+} -abhängige Bindung her. Zu den bekanntesten unter ihnen zählen die E-(epithelial), N-(neural), P-(placental), R-(retinal) und VE-(vasculoendothelial) Cadherine. Intrazellulär sind sie über einen Molekülkomplex, welcher unter anderem β -Catenin enthält, mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Neben seiner interzellulären Adhäsionsfunktion, ist das E-Cadherin auch an der Aktivierung multipler intrazellulärer Signalwege beteiligt. Einer der bekanntesten unter diesen ist der β -Catenin/ ELF/ TCF (*lymphoid enhancer factor/ T-cell factor*)-Signalweg (sog. Wnt-Signalweg).

Im malignen Melanom geht, wie mehrere Studien bisher gezeigt haben, die Progression von der RGP zu invasiven und metastatischen Phasen mit einer

verminderten E-Cadherin-Expression einher. Stattdessen exprimieren die transformierten Zellen vermehrt N-Cadherin. Dies führt zu ihrer Befreiung aus der Bindung mit E-Cadherin exprimierenden Keratinozyten und begünstigt damit eine Invasion in die Dermis, die unter anderem N-Cadherin exprimierende Fibroblasten enthält.^{68, 69} Aber auch bei der transendothelialen Migration der Melanomzellen spielt der Wechsel der E-Cadherin- zu N-Cadherin-Expression sowie die Aktivierung des Wnt-Signalwegs eine entscheidende Rolle.⁷⁰

1.6.5 Wichtige Signalwege im malignen Melanom

Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie eine Reihe anderer äußerer Einflüsse führen über Rezeptoren auf der Zelloberfläche zur Aktivierung von Signalwegen, die über Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Gene beeinflussen und damit eine Antwort auf den äußeren Einfluss auslösen. Genmutationen können zur Dysregulation wichtiger Signalwege führen, welche in normalen Zellen Zellwachstum und Überleben kontrollieren, in dysreguliertem Zustand aber über die Induktion von unkontrollierter Proliferation oder Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Reizen, entscheidend zur Entstehung oder Progression eines Tumors beitragen können. Zwei dieser Signalwege, die sich im malignen Melanom häufig dysreguliert finden, werden im Folgenden näher beschrieben.

1.6.5.1 Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg

Der Ras/Raf/MEK (*MAP-ERK-kinase*)/ ERK (*extracellular signal regulated kinase*)/ MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalweg, der wegen seiner wachstumsfördernden Funktion bisher oft mit Tumorentwicklung in Zusammenhang gebracht wurde, findet sich auch im malignen Melanom häufig vermehrt aktiviert (schematische Darstellung des Signalwegs in Abbildung 2).^{71, 72} In gesunden Melanozyten kann dieser Signalweg über Wachstumsfaktoren wie bFGF oder Hepatozytenwachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor*, HGF) aktiviert werden, führt normalerweise jedoch nur zu einer schwachen und transienten Aktivierung von ERK. Genmutationen oberhalb dieser Signalkaskade, die in bestimmten Tumoren mit hoher Häufigkeit auftreten, können hingegen eine beständige Aktivierung dieser Kinasen bewirken.

So liegt beispielsweise N-Ras in 15 - 30% der Melanome mutiert vor. Ein mutiertes B-Raf, das Ras-Signale an MEK koppelt, findet sich sogar in bis zu 70% aller Melanome.^{71, 73} Durch sog. gain-of-function-Mutationen dieser Gene wird eine beständige Stimulierung von ERK aufrechterhalten, was die Proliferation und das Überleben der Zellen fördert. Zielmoleküle von ERK sind unter anderen

Transkriptionsfaktoren MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*)⁷⁴ und NFκB,⁷⁵ sowie Zellzyklusmediatoren Cyklin D1⁷⁶ und p16INK4a.⁷⁷

Es sei noch erwähnt, dass sich B-Raf-Mutationen sowohl in benignen Nävi als auch in primären und metastatischen Melanomen in einer ähnlichen Häufigkeit finden.⁷⁸ Bemerkenswerterweise verbleiben die meisten Nävi ein Leben lang im Zellzyklusarrest und entwickeln sich nur selten zum Melanom. Dies ist möglicherweise auf eine in benignen Nävi oft zur gleichen Zeit vorliegende Hochregulation der Zellzyklus-hemmenden Kinase-4a (p16 INK4a) zurückzuführen, ein Tumorsuppressor, welcher in späteren Stadien des Melanoms ebenfalls häufig mutiert vorkommt.⁷⁷

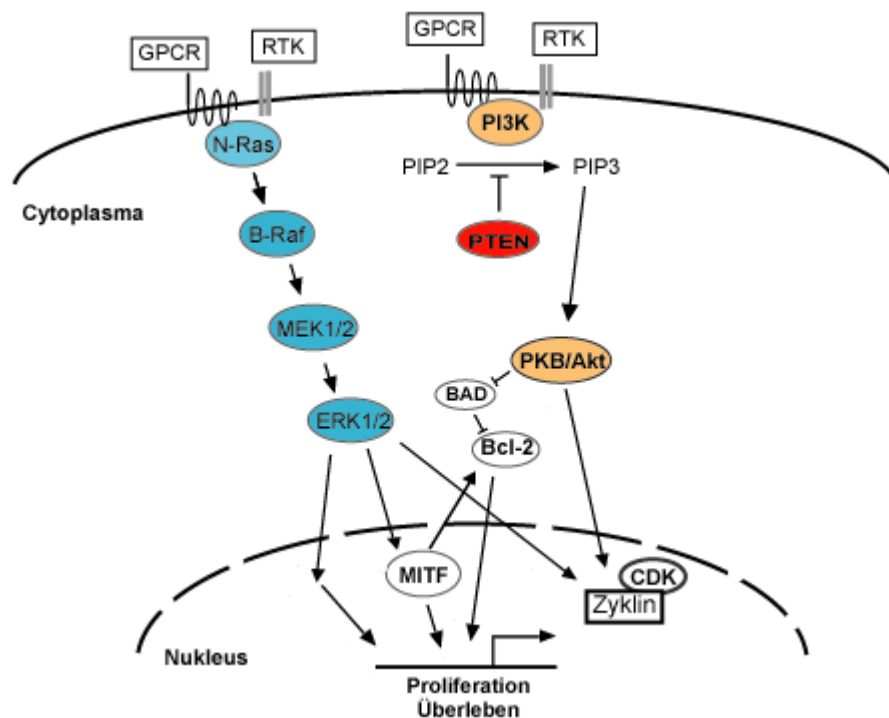


Abb. 2: Ras/ Raf/ MEK/ ERK- und PI3K/ PKB/ Akt-Signalwege.

Abkürzungen: GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor; PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat; PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase; PTEN: *Phosphatase and tensin homologue*; PKB/ Akt: Proteinkinase B; BAD: *Bcl-2-antagonist of cell death*; RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase; CDK: *Cyclin-dependent kinase*; MEK 1/ 2: MAP-ERK-Kinase; ERK 1/ 2: *Extracellular-signal regulated kinase*; MITF: *Microphthalmia-associated transcription factor*.

1.6.5.2 PI3K/Akt-Signalweg

Ein weiterer Signalweg, der im Melanom in Bezug auf Zellwachstum, -proliferation und -überleben eine wichtige Rolle spielt, ist der Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalweg (siehe Abbildung 2). Phosphoinositide sind Membranlipide, die durch Hyperphosphorylierung mittels PI3-Kinasen in Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat

(PIP₃) umgewandelt werden. Ihre Aktivierung erfolgt durch Integrine, Komponenten der ECM wie z.B. Fibronektin und Wachstumsfaktoren wie IGF (*insulin-like growth factor*) - 1 oder HGF. Das aktivierte PIP₃ führt wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase B, auch Akt genannt. Eine erhöhte Akt-Aktivität hat beispielsweise über die Inaktivierung von BAD eine anti-apoptotische Wirkung. Akt kann auch Kinasen wie Cyclin D1, -3, und CDK 4 induzieren, welche wiederum die Zellzyklusprogression fördern und damit auch die Proliferation von Tumorzellen. Weitere Zielmoleküle von Akt sind Transkriptionsfaktoren, zu welchen unter anderem NFκB⁷⁹ und AP-1 zählen.

Ein wichtiges Molekül, das die Aktivierung von PIP₃ hemmt, ist PTEN (*phosphatase and tensin homologue*). Es handelt sich hierbei um einen Tumorsuppressor, der in 10-15% der sporadischen Melanome mutiert vorliegt.²⁴ Funktionelle Studien haben gezeigt, dass eine ektopische PTEN-Expression in PTEN-defizienten Melanomzellen, die Akt-Aktivität reduzierte und damit Wachstum und Metastasierung hemmte sowie Apoptose induzierte.⁸⁰

2 Transkriptionsfaktoren im malignen Melanom

Während genetische Veränderungen in frühen Stadien der Melanomentwicklung auftreten, ist die Progression des Melanoms hin zu metastatischen Formen überwiegend durch die dysregulierte Expression einer Reihe von Transkriptionsfaktoren bedingt.⁸¹ Zu den wichtigen, bislang in mehreren Studien charakterisierten Transkriptionsfaktoren gehören unter anderem CREB/ATF-1 (*cAMP-responsive element (CRE)-binding protein/ activating transcription factor-1*)⁸², AP-1 (*activation protein-1*)⁸³, AP-2 alpha (*activating enhancer binding protein-2alpha*)⁸⁴, LEF/TCF (*lymphoid encancer factor/ T-cell factor*)⁸⁵, MITF⁸⁶ und STAT (*signal transducers and activators of transcription*)⁸⁷ (zur Übersicht⁸¹). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der sogenannte Nukleäre Faktor-kappaB (NFκB), dessen wichtige Bedeutung bei der Immunabwehr sowie bei Entzündungen und Infektionen inzwischen unumstritten ist und dessen Einfluss auch auf die Entwicklung einiger Tumoren nachgewiesen werden konnte, wurde im Zusammenhang mit dem malignen Melanom bislang kaum untersucht.

Nach einer kurzen Einführung in die allgemeinen Grundlagen der transkriptionellen Genregulation soll dieser Transkriptionsfaktor im Folgenden näher beleuchtet werden.

2.1 Allgemeine Grundlagen der transkriptionellen Genregulation

Die Möglichkeit der gesteuerten Genexpression in eukaryontischen Zellen ist eine wichtige Voraussetzung dafür, dass ausdifferenzierte Zellen trotz gleicher genetischer Ausstattung durch die Synthese einer bestimmten Auswahl und Menge an

verschiedenen Proteinen ihre charakteristischen Eigenschaften und spezialisierte Funktionen erhalten.

Die transkriptionelle Genregulation wird im Wesentlichen von der regulatorischen Region eines Genes bestimmt, die die Anweisung für die räumlich und zeitlich korrekte Expression der kodierten Gene enthält. Dieser Bereich enthält konservierte DNA-Sequenzmotive, an die regulatorische Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren binden. Die an diese DNA-Elemente gebundenen Transkriptionsfaktoren steuern die Aktivität der RNA-Polymerase II und damit die mRNA-Synthese (Transkription). Es werden zwei Arten von Sequenzmotiven unterschieden: Promotor und Enhancer/Silencer-Elemente. Der Promotor liegt dabei meist im 5'-Bereich des ersten Exons eines Gens. Hier bindet unter Beteiligung weiterer allgemeiner Transkriptionsfaktoren die RNA-Polymerase II an die DNA und beginnt mit der mRNA-Synthese. Zu den Promotorsequenzelementen gehören die TATA-Box, CAAT-Box und GC-Box. Die Zusammenlagerung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die von der RNA-Polymerase II erkannt werden, beginnt an der TATA-Box. Die an die CAAT-Box- und die GC-Box-bindenden Transkriptionsfaktoren werden mit der Ablesefrequenz des Gens durch die RNA-Polymerase II in Zusammenhang gebracht.

Nahezu alle eukaryontischen Promotoren benötigen zusätzliche spezifische Transkriptionsfaktoren, welche die Zusammenlagerung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase unterstützen. DNA-Sequenzen, an die spezifische Transkriptionsfaktoren binden, werden Enhancer (Verstärkerelemente der Transkription) oder Silencer (negativ regulatorische Elemente) genannt. Im Gegensatz zur Position der Promotersequenz, können Enhancer/ Silencer bis zu mehrere tausend Basen vor oder hinter dem Gen liegen. Ihnen kommt bei der Bestimmung der Transkriptionsrate eines Gens eine wichtige Bedeutung zu. Entsprechend existieren spezielle Transkriptionsfaktoren, die als transkriptionale Aktivatoren fungieren, und solche, die die Funktion von transkriptionalen Repressoren haben. Transkriptionsfaktoren können entweder zellspezifisch oder aber ubiquitär in allen Zelltypen vorkommen. Weiterhin gibt es Transkriptionsfaktoren, die ständig (konstitutiv) aktiviert sind. Andere hingegen liegen lediglich zeitlich begrenzt (transient), als Reaktion auf bestimmte Stimuli, in ihrer aktivierten Form vor.

2.2 Der Transkriptionsfaktor NFκB

Der Nukleäre Faktor-kappa B (NFκB) wurde 1986 zuerst von Sen und Baltimore als ein Transkriptionsfaktor an einer charakteristischen DNA-Region, dem Immunglobulin-kappa-Leichtketten-Enhancer, in reifen B-Lymphozyten der Maus beschrieben.⁸⁸ Weitere Analysen ergaben, dass NFκB ein ubiquitär vorkommender

Transkriptionsfaktor ist, der als Genschalter und zentraler Koordinator der menschlichen Immunantwort fungiert.⁸⁹

2.2.1 Struktur von NF κ B

Die Bezeichnung NF κ B ist eine Sammelbezeichnung für eine Familie von Signalproteinen, die auch als Rel-Familie bekannt sind. In Säugetieren existieren fünf bekannte Untereinheiten der NF κ B/ Rel-Proteine: p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p50/p105 (NF κ B1) und p52/p100 (NF κ B2).⁹⁰ Ihre Struktur ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Die fünf Untereinheiten sind strukturell verwandt, denn sie alle enthalten eine etwa 300 Aminosäuren (AS) umfassende N-terminale Domäne, die als „REL homology domain“ (RHD) bezeichnet wird.

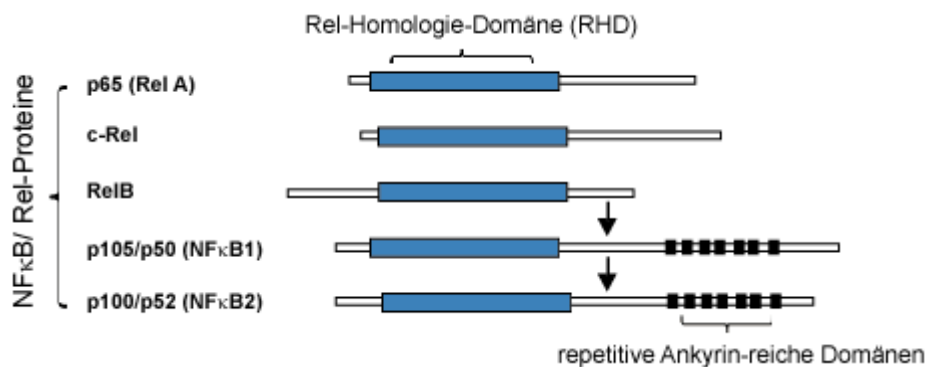


Abb. 3: Die Rel/NF κ B-Proteinfamilie.

Modifiziert nach Baldwin AS Jr., 1996.⁹¹

Innerhalb der RHD befinden sich neben der Dimerisierungsregion, die Bindungsregion für den spezifischen Inhibitor (I κ B), die nukleäre Lokalisationssequenz sowie die Bindestelle für spezielle DNA-Sequenzen (sog. „ κ B-sites“).⁹⁰⁻⁹⁴ Eine Sonderstellung innerhalb dieser Familie nehmen NF κ B1 (p105/p50) und NF κ B2 (p100/p52) ein. Diese besitzen an ihren C-Termini mehrere Kopien Ankyrin-reicher Domänen, welche für das Inhibitormolekül von NF κ B, das I κ B, kodieren, so dass diese NF κ B-Proteine zugleich zur Familie der I κ B-Proteine zählen (siehe unten). Nach einer ubiquitinvermittelten limitierten Proteolyse des C-Terminus hinter der RHD (siehe Pfeile in Abbildung 3), entstehen aus den Vorläuferproteinen p105/p50 und p100/p52 die aktiven, zur DNA-Bindung befähigten Formen p50 beziehungsweise p52, wobei die Ziffern das Molekulargewicht angeben.⁹²⁻⁹⁶

NF κ B tritt beim Menschen als Homo- oder Heterodimer auf. Am häufigsten findet man NF κ B, das aus den Untereinheiten p50/p65 zusammengesetzt ist⁹²⁻⁹⁴, daneben existieren auch Homo- beziehungsweise Heterodimere, welche die Untereinheiten c-Rel, RelB oder p52 beinhalten können.

Rel A, RelB und cRel besitzen in ihren C-terminalen Hälften transkriptionsaktivierende Domänen (TADs), welche sie dazu befähigt, kotranskriptionale Regulatoren und die basale Transkriptionsmaschinerie an ihren Zielgenen zu rekrutieren.⁹⁷ Die Untereinheiten p50 und p52 besitzen hingegen keine TADs. Ihnen fehlt das transaktivierende Potential, es sei denn, sie sind mit einem die TADs enthaltenden NFκB-Mitglied assoziiert.⁹⁸

2.2.2 Aktivierung von NFκB

Die Aktivierung von NFκB wird posttranskriptionell reguliert. Das bedeutet, dass es in der Zelle bereits als Protein vorliegt und für seine Aktivierung nicht neu synthetisiert werden muss. Folglich kann man zwei Formen von NFκB unterscheiden: eine inaktive Form, die sich im Cytoplasma befindet, und eine aktivierte Form, die in den Zellkern translozieren kann, um dort ihre transkriptionsfördernde oder -hemmende Wirkung zu entfalten. In Antikörper-produzierenden B-Zellen sowie aktivierten T-Zellen und Makrophagen ist NFκB dauerhaft aktiviert.⁸⁸ In den meisten anderen Zelltypen wird das NFκB hingegen in seiner inaktiven Form im Zytoplasma zurückgehalten, bedingt durch die direkte Bindung an eines seiner Inhibitorproteine IκB.

Die Aktivierung der zytoplasmatischen Form von NFκB erfolgt im Allgemeinen durch die Stimulation der Zelle mit pathogenen Signalen (zur Übersicht ⁹⁹). Es stellte sich heraus, dass NFκB ein pluripotenter Aktivierungsfaktor einer zellulären Antwort auf Veränderungen in der Umwelt ist.¹⁰⁰ Die Stimuli, die NFκB aktivieren können, reichen von infektiösen Agentien (Viren, Bakterien, Parasiten und ihre Produkte) über biochemische Reize und zelluläre Botenstoffe wie proinflammatorische Zytokine (TNF-α, IL-1β, EGF), Hormone oder Wachstumsfaktoren^{91, 101} bis hin zu physikalischem (ionisierende Strahlung, UV-Licht) und chemischem Stress (chemotherapeutische Substanzen).^{102, 103}

Die Einwirkung dieser Stimuli auf die Zelle erfolgt über verschiedene Rezeptoren, die unter anderem den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-, den Toll-like Rezeptor (TLR)- und den Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R)-Superfamilien angehören.¹⁰⁴ Nach Bindung eines spezifischen Liganden an seinen Rezeptor, rekrutiert dieser auf cytoplasmatischer Seite entsprechende Kinasen, die als sogenannte Ankerproteine weitere Kinasen aktivieren können. Damit wird ein bestimmter Signalweg eingeschlagen. Je nach Stimulus können der Aktivierung von NFκB verschiedene Signalwege vorgeschaltet sein. Dazu zählen insbesondere der MAPK, der PI3K/ Akt- und der NFκB-inducing kinase (NIK)-Signalweg. Sie alle konvergieren in der Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes (IKK), der aus drei Komponenten zusammengesetzt ist: die Ser/ Thr-Kinasen IκB-Kinase-α (IKKα) und IκB-Kinase-β.

(IKK β) als katalytische Einheiten und die regulatorische Einheit IKK γ , welche auch als *NF κ B essential modifier* (NEMO) bezeichnet wird (siehe Abbildung 4).

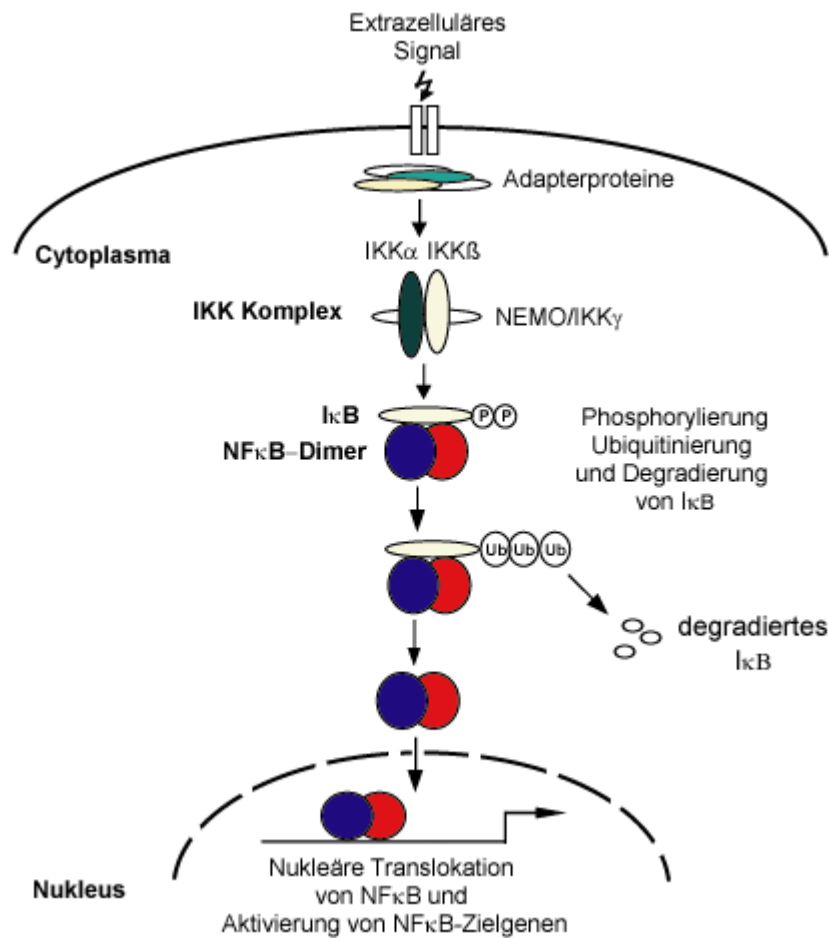


Abb. 4: Schematische Darstellung der NF κ B-Aktivierung

Als Antwort auf ein extrazelluläres Signal wird nach einer Reihe von Phosphorylierungsschritten an verschiedenen Ankerproteinen mit Kinasenfunktion der IKK-Komplex aktiviert. Dieser führt über die Phosphorylierung von I κ B zur Ubiquitinierung und Degradation des NF κ B-Inhibitormoleküls. Dies hat eine Freisetzung und Aktivierung von NF κ B zur Folge. Das freigesetzte NF κ B-Dimer wandert in den Nukleus und nimmt dort durch Bindung an NF κ B-Konsensussequenzmotive im Promotorbereich bestimmter Gene Einfluss auf die Gentranskription. Verändert nach A Israel, 2000.¹⁰⁵

Der aktivierte IKK-Komplex katalysiert die Phosphorylierung des Inhibitormoleküls I κ B an Ser32 und Ser36 bei I κ B α beziehungsweise von Ser19 und Ser23 bei I κ B β und führt damit zu dessen Poly-Ubiquitinierung und anschließender Degradation durch das 26S-Proteasom.^{105, 106}

Damit ist die nukleäre Lokalisationssequenz von NF κ B nicht länger maskiert, sodass das auf diese Weise aktivierte NF κ B-Dimer nun in den Nukleus transloziert, wo es seine Wirkung auf die Transkription seiner Zielgene entfaltet.

2.2.3 Regulation von NFκB

Die Aktivierung von NFκB in gesunden Zellen ist ein zeitlich limitierter Prozess, der insbesondere durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert wird. Dies basiert auf der Tatsache, dass aktiviertes NFκB in der Lage ist, mit zeitlicher Verzögerung die Expression seines eigenen Inhibitors IκBα (siehe unten) zu induzieren.¹⁰⁷ Neu synthetisiertes IκBα wandert in den Zellkern, wo es aktiviertes NFκB aus seiner DNA-Bindung löst und dieses in der Folge wieder ins Cytoplasma zurück transportiert.¹⁰⁸ Ähnlich wie bei NFκB, besteht die IκB-Familie bei Säugetieren aus 7 IκB-Proteinen: IκBα, IκBβ und IκBε als wichtigste Vertreter und Bcl-3, IκBζ sowie die C-terminalen Enden von p100 (NFκB2; IκBδ) und p105 (NFκB1; IκBγ). Alle IκB-Proteine zeichnen sich durch Wiederholungen von Ankyrin-Domänen aus. Mit Ausnahme von Bcl-3 interagieren diese inhibitorischen Proteine über ihre Ankyrin-Domänen mit der RH-Domäne der NFκB-Proteine, maskieren damit ihre nukleäre Lokalisationssequenz und verhindern so ihre Translokation in den Nukleus. Das IκB-verwandte Protein Bcl-3 kommt nukleär vor und funktioniert, anders als die übrigen IκB-Proteine, als transkriptioneller Cofaktor.⁹⁰ IκB-α enthält zudem im Gegensatz zu anderen IκBs eine nukleäre Export-Sequenz (NES) und ist damit in der Lage, NFκB-Dimere aus dem Zellkern zurück ins Cytoplasma zu transportieren.^{108, 109}

IκB-Proteine besitzen unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Rel-Proteinen. So bedeckt IκB-α ausschließlich die NLS von p65, während IκB-β als ein cytoplasmatisches Protein die NLS sowohl von p65 als auch von p50, c-Rel und Rel B blockieren kann.^{110, 111}

2.2.4 Signalwege der NFκB-Aktivierung

Der oben beschriebene Mechanismus der NFκB-Aktivierung, der auch als der klassische Signalweg bezeichnet wird, hängt im Wesentlichen vom IκB-Kinase-Komplex ab. Dieser ist beim klassischen Signalweg aus den beiden katalytischen Einheiten IKK-α und IKK-β (Ser/ Thr-Kinasen), sowie der regulatorische Einheit IKK-γ, auch *NFκB essential modulator* (NEMO) genannt, zusammengesetzt. Im Rahmen dieses Signalweges werden vorwiegend p65-haltige Dimere aktiviert, insbesondere das am häufigsten vorkommende p65/p50-Dimer.¹⁰⁴

Daneben existiert ein alternativer NFκB-Signalweg. Dieser wird durch spezifische extrazelluläre Liganden wie LPS, BAFF und das latente Membranprotein-1 des Epstein-Barr-Virus über die Bindung an CD40- oder Lymphotoxin-β-Rezeptor, aktiviert.¹⁰⁴ Bei diesem Signalweg wird der p100-RelB Komplex im Rahmen der posttranslationalen Modifikation zur aktiven Form p52-Rel B prozessiert.¹¹² Dies geschieht über die NFκB-induzierende-Kinase (NIK),¹¹³ deren Substrat ein IKK-α-

Homodimer ist.^{112, 114} IKK- β und NEMO haben keinen Einfluss auf die Aktivierung von p52-Dimeren durch NIK, was darauf hindeutet, dass NIK-aktiviertes IKK- α nicht Bestandteil des IKK-Komplexes ist.¹¹⁵ Auch hängt dieser Signalweg im Gegensatz zum klassischen Signalweg nicht unmittelbar mit dem angeborenen Immunsystem oder mit Entzündungsprozessen zusammen, sondern spielt vielmehr bei der Entwicklung der sekundären Lymphorgane und der B-Zell-Reifung eine Rolle.¹⁰⁴

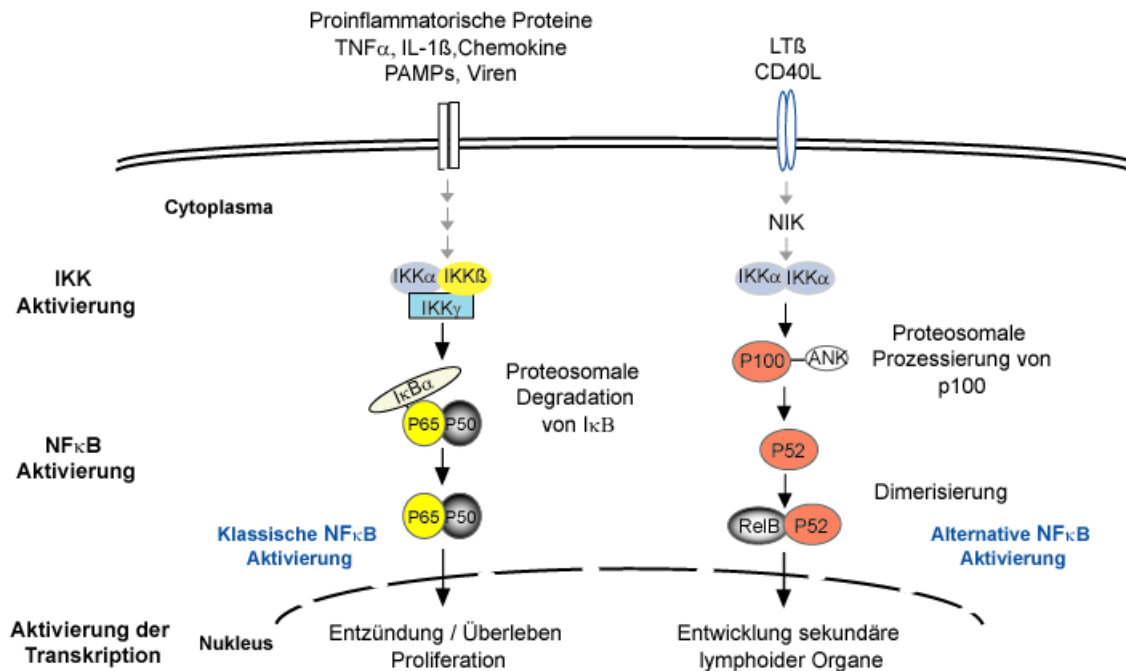


Abb. 5: Schematische Darstellung des klassischen und des alternativen Signalweges der NFκB-Aktivierung.

Aktivierung und Translokation verschiedener NFκB-Dimere nach Stimulierung einer Zelle durch die jeweiligen Liganden. Abkürzungen: LTβ: Lymphotoxin β, PAMPs: pathogen associated molecular patterns (hoch konservierte Bestandteile von Erregern). Modifiziert nach Richmond et al., 2006.⁹⁴

Die transkriptionelle Aktivität von NFκB wird zum Teil auch durch eine Reihe von post-translationalen Modifikationen der NFκB-Untereinheiten reguliert. Diese Modifikationen können im Zytoplasma oder im Kern über Interaktionen mit anderen Proteinen, so z.B. anderen Transkriptionsfaktoren oder Coaktivatoren erfolgen (Übersicht in ¹¹⁴). Sie können sowohl die Translokation des NFκB-Komplexes in den Kern als auch sein Transaktivierungspotential beeinflussen. Letzteres kann dabei gesteigert, aber auch gemindert werden.

2.2.5 Wirkung von NFκB

NFκB bindet im Nukleus an DNA-Bindestellen mit der Sequenz 5'GGGRNYYCC3' (R = Purin, Y = Pyrimidin, N = R oder Y),⁹¹ den sog. κB-sites, die sich in Promotoren und

Enhancern bestimmter Gene befinden, und initiiert damit die Transkription dieser Gene. Einzelne Dimere können mit unterschiedlich hoher Affinität und Spezifität auch an von dieser Sequenz gering abweichende DNA-Sequenzen binden, wodurch ein Netzwerk an unterschiedlichen Aktivierungsmustern der Zielgene erreicht wird.¹¹⁶

Der Vielfalt an Stimuli, die NFκB aktivieren können, steht eine nicht minder große Anzahl an Genen gegenüber, die durch NFκB reguliert werden.¹¹⁷

Die bisher bekannten Funktionen von NFκB werden im Folgenden näher betrachtet.

2.2.6 Rolle von NFκB im Immunsystem und bei Entzündungen

Diverse Studien an Knockout-Mäusen haben entscheidend dazu beigetragen, verschiedene **Funktionen der einzelnen Mitglieder** der NFκB-Familie zu analysieren.¹¹⁸⁻¹²⁰

Dabei stellte sich heraus, dass einige NFκB-Proteine eine zentrale Bedeutung in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr haben (zur Übersicht ¹²¹). So zeigten p50-defiziente Mäuse neben einer gestörten B-Zellproliferation nach Stimulation mit bestimmten Mitogenen, welche auf einen Zellzyklus-Block in der G1-Phase zurückzuführen war, eine erhöhte Mitogen-induzierte Apoptoserate.¹²² Dies weist darauf hin, dass p50 sowohl für das Überleben, als auch für die Aktivierung der B-Zellen notwendig ist. RelB hingegen spielt bei der Entwicklung und Differenzierung dendritischer Zellen eine wichtige Rolle. Das Fehlen von Rel B in Mäusen resultierte in einer verminderten Antigenpräsentation, was mit einer ineffizienten Vernichtung autoreaktiver Thymozyten und T-Zellen korrelierte.¹²³ Weiterhin stellte man fest, dass reife Lymphozyten und Makrophagen in c-Rel-defizienten Mäusen eine Reihe aktivierungsassoziierter Defekte aufweisen, welche die B- und T-Zellproliferation, den Isotyp-Switch und die Produktion verschiedener Zytokine sowie immunmodulatorischer Moleküle betreffen.^{122, 124, 125}

Das Fehlen von p52 verursacht primär Störungen in Organen der Hämatopoese und Immunität, welche sich in der Folge auf Immunzellen auswirken. Sowohl die perifollikuläre Zone der Milz, in der die Regulation der Zellmigration während der Immunreaktion abläuft, als auch die B-Zell-Follikel der Lymphknoten zeigen in p52-Knockout-Mäusen eine veränderte Morphologie. Dies resultiert in einer gestörten Antigenpräsentation durch akzessorische Zellen, zu welchen auch dendritische Zellen gehören.¹²⁶

Neben seiner Rolle im Immunsystem, ist NFκB einer der wichtigsten Regulatoren der Expression proinflammatorischer Gene, welche für entzündliche Prozesse und Akute-Phase-Reaktionen relevant sind. Dazu zählen insbesondere proinflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1, IL-6, Chemokine wie IL-8, immunregulatorische Oberflächenmoleküle sowie Zelladhäsionsmoleküle.¹²⁷

Abbildung 6 zeigt eine Übersicht über die Rolle von NFκB bei der Immunantwort sowie im Rahmen von Akute-Phase- oder Entzündungsreaktionen.

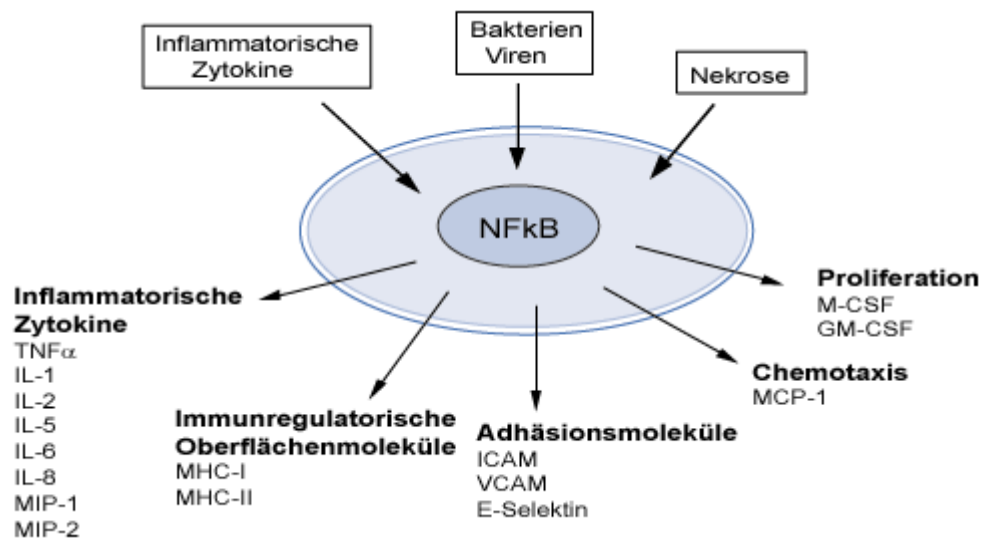


Abb. 6: Rolle von NFκB bei der Immunantwort und Entzündungsreaktionen

Aktivierung von NFκB durch verschiedene Stimuli führt zur Hochregulation von Genen, die eine wichtige Bedeutung bei immunologischen und entzündlichen Reaktionen haben. Abkürzungen: MHC-I/II: *Major histocompatibility complex I/II*; MIP-1/2: *Macrophage inflammatory protein-1/2*; MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*; M-CSF: *Macrophage colony stimulating factor*; GM-CSF: *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*.

Dabei weist die Expression der jeweiligen NFκB-Proteine eine Orts- und Stimulusspezifität auf. Diese Spezifität wird durch die Expressionsmuster anderer regulatorischer Moleküle erhöht, zu welchen neben anderen Transkriptionsfaktoren, Oberflächenrezeptoren für proinflammatorische Zytokine sowie diverse IKK- und IκB-Isotypen zählen. Diese Besonderheiten zusammen mit Variationen an den NFκB-DNA-Bindungsstellen, welche mit bestimmten NFκB-Hetero- und Homodimeren interagieren, ermöglichen es den Zellen, auf die Umgebung zur richtigen Zeit mit der Aktivierung korrekter Gene zu reagieren.

So erfolgt beispielsweise die Aktivierung der IL-1-induzierten Kollagenase-Expression in Synoviozyten primär durch p50-Homodimere über ihre Bindung an die entsprechende κB-Bindungsstelle der DNA.¹²⁸ Für die volle Ausprägung der Kollagenase-Expression wird beispielsweise bei der Kollagenase-3 (MMP13) außer NFκB ein weiterer Transkriptionsfaktor, AP-1, benötigt, dessen Aktivierung nach IL-1-Stimulation durch einen zweiten Signalweg erfolgt.

Bei Entzündungsprozessen erfolgt neben der Expression proinflammatorischer Zytokine auch die Rekrutierung von Granulozyten, Monozyten sowie T-Lymphozyten aus dem Kreislauf an den Ort der Entzündung.¹²⁹ Eine wichtige Voraussetzung hierfür

ist die Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin an den Endothelgefäßen des Entzündungsortes, die die Anheftung der Entzündungszellen an das Endothel sowie ihre Transmigration ins Gewebe erleichtern. Die Aktivierung von NFκB führt zu einer vermehrten Expression dieser Adhäsionsmoleküle und die Hemmung von NFκB reduziert die Leukozytenadhäsion und Transmigration.¹³⁰

Dem Schutzmechanismus, der in normalen Zellen mit einer induzierbaren, jedoch stets transienten Aktivierung von NFκB einhergeht, steht eine dauerhafte Aktivierung von NFκB gegenüber, die durch diverse molekulare Veränderungen bedingt sein kann. In diesem Fall befindet sich NFκB permanent aktiviert im Zellkern, was eine dysregulierte Zielgenexpression zur Folge hat.

Eine lokale, beständig erhöhte Aktivierung von NFκB wurde in diversen Entzündungserkrankungen nachgewiesen (siehe Tabelle 1).

Erkrankungen	Referenz
Rheumatoide Arthritis	Han et al. 1998 ¹³¹
Atherosklerose	Monaco et al. 2004 ¹³²
Multiple Sklerose	Bonetti et al. 1999 ¹³³
Asthma	Hart et al. 1998 ¹³⁴
Entzündliche Darmerkrankungen	Neurath et al. 1998 ¹³⁵
Helicobacter pylori-assoziierte Gastritis	Van Den Brink et al. 2000 ¹³⁶

Tab. 1: NFκB-Aktivierung in Entzündungserkrankungen

Weitere funktionelle Studien an Tiermodellen konnten die kausale Bedeutung von NFκB in einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen belegen. So führte die selektive NFκB-Aktivierung in Ratten durch intra-artikulären Transfer eines IKK-β-Gens zur Synoviaentzündung und klinischen Zeichen einer Arthritis.¹³⁷ Die NFκB-vermittelte Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in den Nierenglomeruli von Ratten hatte die Entwicklung einer experimentellen Glomerulonephritis zur Folge.¹³⁸ Eine andere Studie stellte an Mausmodellen mit einer entzündlichen Colitis, eine vermehrte NFκB-Aktivierung im Kolonepithel fest, welche von einer erhöhten TNF-α und IL-1β-Expression begleitet war.¹³⁹ Weiterhin zeigte sich bei p50-Knockout-Mausmodellen mit allergischem Asthma eine reduzierte eosinophile Reaktion der Atemwege, die mit einer verminderten Produktion von Zytokinen wie IL-5, MIP-1α und MIP-1β einherging, welche wiederum für die Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten an den Entzündungsort verantwortlich gemacht werden. Ähnliche Ergebnisse brachte auch eine weitere Studie an c-Rel-Knockout-Mäusen hervor.¹⁴⁰ Alle diese Beobachtungen

untermauern die These, dass NFκB in akuten und chronischen Entzündungen eine wichtige Rolle spielt.

2.2.7 NFκB in Tumoren

Ein Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumoren wurde bereits lange Zeit vor der Entdeckung von NFκB angenommen. Auch wenn Virchow bereits im 19. Jahrhundert vermutete, dass chronische Entzündungsprozesse zur Entstehung von Malignitäten beitragen könnten, war das eigentliche Verbindungsglied zwischen Entzündung und Tumoren bis vor einigen Jahren nicht bekannt.^{141, 142} Dass 15-20% aller durch Tumorerkrankungen verursachten Todesfälle im Zusammenhang mit Infektionen und Entzündungen stehen, konnte die Arbeitsgruppe um H Kuper im Jahr 2000 demonstrieren.¹⁴³ So haben eine Reihe epidemiologischer Studien bisher gezeigt, dass chronische Infektionen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) und Hepatitis C Virus (HCV) den größten Risikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) darstellen.¹⁴⁴ Auch eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* ist als Hauptursache für die Entstehung von Magenkarzinomen anerkannt.¹⁴⁵ Ebenso erhöhen chronisch inflammatorische Darmerkrankungen wie z.B. Colitis ulcerosa das Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, um etwa 1% pro Jahr.¹⁴⁶ Dabei nimmt man an, dass chronische Inflammation im Laufe der Zeit umfangreiche DNA-Schäden induziert, die schließlich zur Entwicklung von Tumoren führen.¹⁴⁷

Angesichts der aus epidemiologischen Studien hervorgehenden Korrelationen, stellt sich die Frage nach der Kausalität, in wieweit ein chronisches Entzündungsgeschehen zur Tumorentstehung oder -progression beiträgt. Um diese Frage zu beantworten, sollte man sich die zellulären Prozesse vor Augen führen, die zur Entstehung einer Neoplasie und ihrer Progression beitragen. Hanahan und Weinberg fassten diese zusammen als Selbstgenügsamkeit an Wachstumssignalen, Nichtansprechbarkeit gegenüber wachstumshemmenden und pro-apoptotischen Signalen, uneingeschränktes Replikationspotential, Gewebsinvasion, Metastasierung und eine fortwährende Aktivierung der Angiogenese.¹⁴⁸

Wie verschiedene Arbeitsgruppen in den vergangenen Jahren gezeigt haben, trägt NFκB im Rahmen einer Entzündung über Induktion bestimmter Zielgene zu vielen tumorrelevanten Prozessen bei (siehe Abbildung 7).^{149, 150}

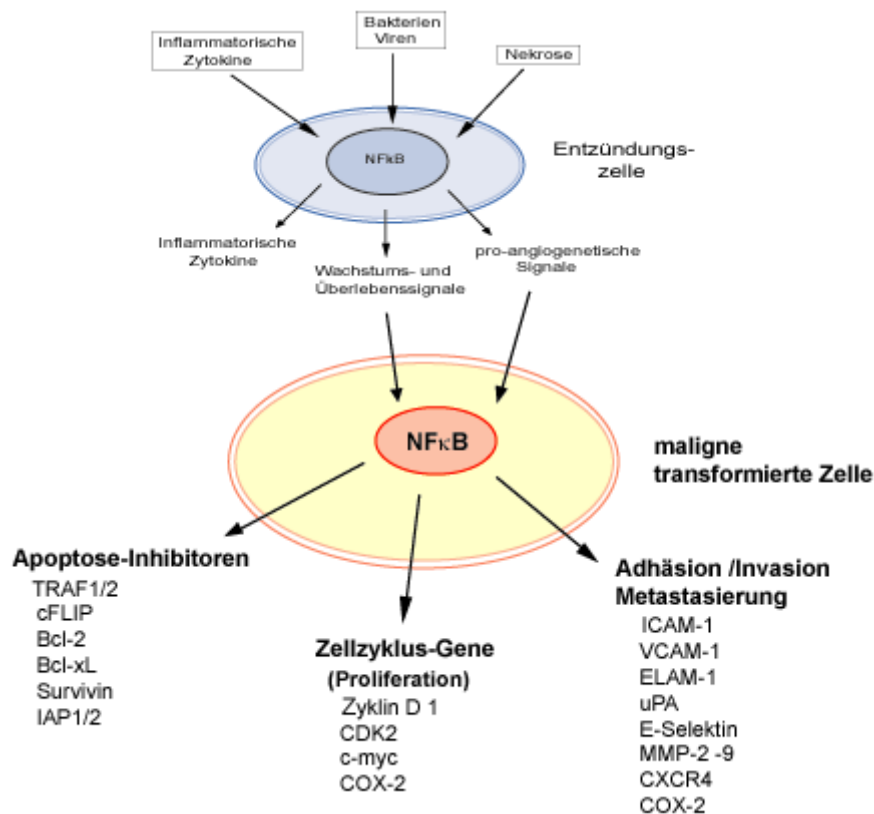


Abb. 7: NFκB-Aktivierung, Interaktion zwischen Entzündungszellen und maligne transformierten Zellen und Mechanismen, durch welche dauerhaft aktiviertes NFκB die Tumorentwicklung und –progression fördert.

Abkürzungen: TRAF 1/2: *Tumor necrosis factor receptor-associated factor*; cFLIP: *Cellular FLICE-inhibitory protein*; IAP 1/2: *Inhibitor of apoptosis protein*; CDK: *Cyclin-dependent kinase*;
Verändert nach M Karin, 2006¹⁰⁴ und Aggarwal et al., 2008.¹⁰²

Eine erhöhte Aktivierung von NFκB wurde bislang in verschiedenen Tumorarten durch zahlreiche Studien nachgewiesen (siehe Tabelle 2).

Tumoren	Referenzen
Akute lymphatische Leukämie	Kordes et al. 2000 ¹⁵¹
Burkitt Lymphom	Rath 2005 ¹⁵²
Kolorektales Karzinom	Lind et al. 2001 ¹⁵³
Hodgkin Lymphom	Bargou et al. 1997 ¹⁵⁴
Mammakarzinom	Cogswell et al. 2000 ¹⁵⁵
Mantelzelllymphom	Shishodia et al. 2005 ¹⁵⁶
Multiples Myelom	Feinman et al. 2004 ¹⁵⁷
Lungenkarzinom	Baby et al. 2007 ¹⁵⁸

Tumoren	Referenzen
Ovarialkarzinom	Dejardin et al. 1999 ¹⁵⁹
Pankreaskarzinom	Wang et al. 1999 ¹⁶⁰
Prostatakarzinom	Suh et al. 2002 ¹⁶¹
Schilddrüsenkarzinom	Visconti et al. 1987 ¹⁶²

Tab. 2: Dauerhafte NFκB-Aktivierung in humanen Zelllinien

Modifiziert nach Sethi et al., 2008.¹⁰²

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie NFκB von seinen üblichen Regulationsmechanismen entkoppelt werden kann, und was schließlich mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang stehen kann. Zum Beispiel führt das Geflügel-Onkovirus REV-T zur dauerhaften Expression von aktivem v-REL-Onkoprotein, welches Lymphome und Leukämien mit rascher Progressionstendenz verursacht.¹⁶³ Andere Studien zeigten, dass das Onkoprotein Tax des humanen T-Zell-Leukämie Virus (HTLV)-1 direkt mit dem IKK-Komplex interagiert und diesen dauerhaft aktiviert, was wiederum zur Aktivierung der beiden wichtigen NFκB-Signalwege führt.¹⁶⁴ Aber auch bei anderen Onkoproteinen konnte eine direkte Beteiligung an der NFκB-Aktivierung durch verschiedene Mechanismen nachgewiesen werden.¹⁶⁵

Tumor-assoziierte chromosomale Translokationen, Deletionen und Mutationen können ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Gene führen, welche NFκB- und IκB-Proteine kodieren, was in einer Entkopplung des NFκB von seinen Regulatoren und damit in seiner beständigen Aktivierung resultiert. Aber auch auto- und parakrine Wirkungen inflammatorischer Zytokine, bedingt beispielsweise durch chronische Infektionen oder Entzündungen, sowie Mutationen in Genen vorgeschalteter Signalmoleküle können die Aktivität des IKK-Komplexes stimulieren, was ebenfalls zu einer dauerhaften NFκB-Aktivierung führt.¹⁶⁶ Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass in Tumoren häufig auftretende Genmutationen, wie z.B. Mutationen von N-Ras, B-Raf, PTEN oder p16 INK4a (siehe oben), direkt oder indirekt an der NFκB-Aktivierung beteiligt sind (Übersicht in ⁹⁴, siehe auch Abbildung 8).

Die Beziehung zwischen einigen häufigen Genmutationen und der Aktivierung von NFκB sind am Beispiel des malignen Melanoms in Abbildung 8 dargestellt.

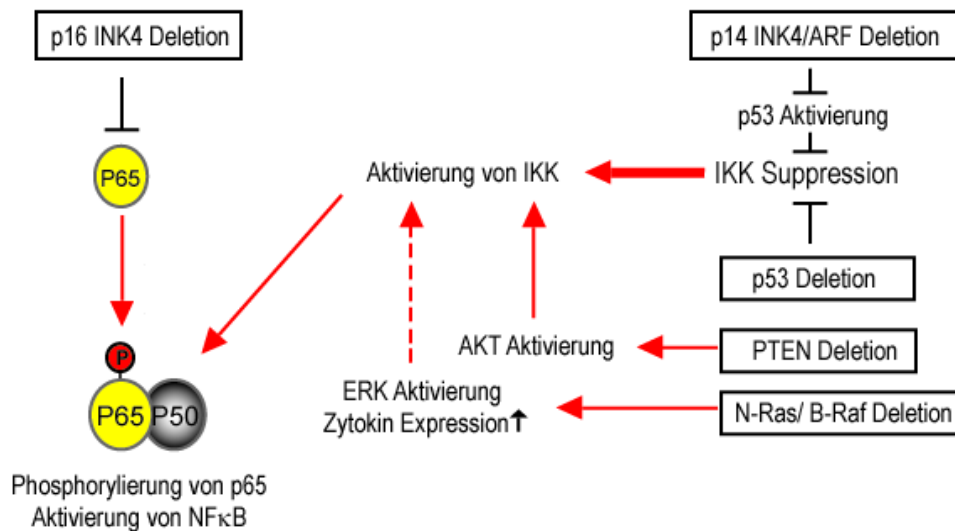


Abb. 8: Genmutationen im malignen Melanom und NFκB-Aktivierung

Genmutationen, die häufig beim malignen Melanom auftreten, sind eingerahmt. Diese Mutationen sind direkt oder indirekt an der Induktion der NFκB-Aktivierung beteiligt. Durchgehende, rote Pfeile zeigen eine direkte positive Regulation, unterbrochene Pfeile stehen für eine indirekte positive Regulation. Modifiziert nach Ueda und Richmond, 2006.⁹⁴

Zum Verständnis, an welchen der oben genannten Prozesse des malignen Phänotyps NFκB involviert ist, haben In-vitro- und In-vivo-Funktionsstudien, in welchen NFκB gehemmt wurde, beigetragen.

So wurde bislang mehrfach gezeigt, dass NFκB ein wichtiger Induktor einer Reihe von anti-apoptotischen Genen ist (Übersicht in ¹⁶⁷). Zu diesen Genen zählen beispielsweise c-FLIP (Hemmung von Caspase-8),¹⁶⁸ cIAP1 und cIAP2 (Hemmung von Caspase-3 und Caspase-9),¹⁶⁹ das anti-apoptotische Bcl2-Protein Bcl-x_L¹⁶⁹ sowie TRAF1 und TRAF2.¹⁷⁰

Andere Studien zeigten, dass viele Gene, die die Zellproliferation steuern, von NFκB reguliert werden. Zu diesen zählen neben Wachstumsfaktoren wie TNF-α, IL-1β und IL-6¹⁰³ auch bestimmte Zellzyklus-Regulationsproteine wie etwa Cyclin D1, welches beim Übergang von der G1- in die S-Phase eine wichtige Rolle spielt.¹⁷¹ Auch PGE2 kann in einigen Tumorzellen die Proliferation stimulieren. Die Synthese von COX-2, welches die PGE2-Produktion kontrolliert, wird dabei durch aktiviertes NFκB reguliert.¹⁷² Aus anderen Studien ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF ebenfalls die Proliferation von Tumorzellen über NFκB induzieren können.¹⁷³

Einige Proteasen wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und die Serin-Protease Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) (siehe Proteasen beim Melanom), die die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen durch ECM-Degradation fördern (siehe oben), werden ebenfalls durch NFκB reguliert.^{59, 174} So berichtete die Arbeitsgruppe um Novak, dass der transkriptionellen Aktivierung des uPA-Gens durch

IL-1 β und TNF- α , die Induktion der NF κ B-Aktivität sowie der Abbau seines Repressor-Moleküls I κ B vorausgeht. Sie identifizierten ferner eine NF κ B-Konsensussequenz im uPA-Promotor, über die RelA die uPA-Expression direkt aktivieren kann.¹⁷⁴

Der Umbau der ECM durch Proteasen kann darüber hinaus durch Veränderungen der Bioverfügbarkeit von pro-angiogenen Faktoren wie VEGF, bFGF und TGF- β die Angiogenese fördern - ein Prozess, der für Tumorzellwachstum sowie -metastasierung von entscheidender Bedeutung ist (zur Übersicht ¹⁷⁵). Daneben gibt es direkt an der Angiogenese beteiligte Faktoren wie beispielsweise die Chemokine MCP-1 und IL-8, welche unter der transkriptionellen Regulation von NF κ B stehen.¹⁷⁶ So zeigte die Arbeitsgruppe um Yu, dass eine Assoziation zwischen der erhöhten Expression von NF κ B, VEGF sowie einer erhöhten Gefäßdichte in humanem kolorektalen Karzinom besteht.¹⁷⁷ Funktionelle In-vivo- und In-vitro-Daten hierzu kamen aus der Arbeitsgruppe von Pollet, die zeigten, dass NF κ B an der endothelialen Einsprossung beteiligt ist.¹⁷⁸

Die Beteiligung von NF κ B bei der Metastasierung von Tumorzellen wurde in weiteren Studien nachgewiesen. Die Fähigkeit Gefäßwände zu penetrieren, wird durch spezifische Moleküle ermöglicht, die in Endothelzellen der Blutgefäße als Antwort auf eine Reihe von Signalen durch Entzündungszellen exprimiert werden. Zu diesen Molekülen gehören die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ELAM-1 und VCAM-1. Die Expression dieser Moleküle wird unter anderem durch NF κ B reguliert.¹⁷⁹

Neben den oben erwähnten Erkenntnissen zu Struktur, Aktivierung und Regulation von NF κ B sowie seiner bisher sehr gut untersuchten Rolle bei akuten und chronischen Entzündungen wie auch bei diversen verschiedenen Tumoren, ist das Wissen um die Funktion von NF κ B im malignen Melanom unvollständig. Die vorliegende Arbeit diene dazu, einerseits NF κ B beim malignen Melanom zu charakterisieren und andererseits seine Rolle bei der Melanomentstehung und -progression anhand von funktionellen Analysen zu ermitteln.

Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ammoniumpersulfat (APS).....	Amresco (Ohio, USA)
Antifadeflösung	DAKO (Carpinteria, USA)
Blocking-Reagent	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Chloroform.....	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Diethylpyrocarbonat (DEPC).....	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Disodium 3-(4-methoxyspiro (1,2 dioxetane- 2,2'-(5'-Chloro) Tricyclodecan)-4-yl)	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Phenylphosphat (CSPD)-Substrat	
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Isopropanol 100%.....	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Lipofectamine RNAiMAX Reagent	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Oligofectamine Reagent	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
OptiMEM Medium	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Tris-Borat-EDTA (TBE) -Pulver	Amresco (Ohio, USA)
Trizol Reagent	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Amresco (Ohio, USA)

1.2 Radioaktive Chemikalien

[32P]- γ -ATP	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
----------------------------	------------------------------------

1.3 Enzyme

T ₄ -Polynukleotidkinase.....	New England Biolabs (Schwalbach, D)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Expand Reverse Transkriptase	Roche (Basel, CH)
Recombinant RNasin Ribonuclease	Promega (Madison, WI, USA)

1.4 Biologisches Material

1.4.1 Humane Melanomzellen

Die verwendeten Melanomzelllinien wurden von Prof. M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA) bezogen. Die Zellen wurden ursprünglich aus Primärtumoren oder Metastasen isoliert (siehe Tabelle). Die Einteilung der Primärtumoren erfolgte nach histopathologischen Kriterien in *radial growth phase* (RGP), *vertical growth phase* (VGP), invasiv und metastatisch. Zu den meisten der verwendeten Zelllinien liegen ebenfalls Informationen zu klinischem Stadium, Invasionstiefe und Ort des Primärtumors beziehungsweise der Metastasierung vor. Die Stadieneinteilung erfolgte entsprechend der AJCC Klassifikation. Die Eindringtiefe (ET) des Primärtumors wurde gemäß der Klassifikation nach Clark angegeben.

<i>Histo-pathologisches Stadium</i>	<i>Zelllinie</i>	<i>AJCC Stadium/ klinische Klassifikation</i>	<i>Clark Level/ ET (mm)</i>	<i>Mutation</i>	<i>Lokalisation</i>
RGP	WM35	1/ SSM	II/0,69	B-Raf (V599E)	Kopfhaut/ Nacken
	WM3208	n.v.	n.v.	n.v.	Gesäss
	WM3211	1/ n.v.	n.v.	n.v.	Fussgelenk
	SbCl2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
VGP	WM1366	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
	WM278	2/ NM	n.v.	B-Raf (V599E)	n.v.
Invasiv	WM793	1/ SSM	n.v.	B-Raf (V599E)	n.v.

<i>Histo- patholo- gisches Stadium</i>	<i>Zelllinie</i>	<i>AJCC Stadium/ klinische Klassi- fikation</i>	<i>Clark Level/ ET (mm)</i>	<i>Mutation</i>	<i>Lokalisation</i>
Metastatisch	WM239A	n.v.	III/2,24	n.v.	Leisten- lymphknoten, Beinhaut- metastase
	WM9	n.v.	n.v.	n.v.	Lymphknoten, Axilla
	WM1158	2/SSM	III/2,75	n.v.	Lymphknoten
	451Lu	n.v.	n.v.	n.v.	Lunge
	1205Lu	n.v.	n.v.	n.v.	Lunge
	WM1232	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

Tab. 3: Aufstellung der verwendeten humanen Melanomzelllinien

Abkürzungen: SSM: Superfiziell spreitendes Melanom; NM: primär noduläres Melanom; n.v.: Information nicht verfügbar.

1.4.2 Humane Melanozyten

Die Melanozyten wurden aus der Epidermis humaner Vorhaut isoliert. In der vorliegenden Arbeit wurden 3 verschiedene Melanozytenlinien zwischen Passage (p) 4 und 9 verwendet: HM9 (p7-9), HM47 (p5-7), HM84 (p4-6).

1.5 Materialien für die Zellkultur

Antibiotic-/ antimyotic solutionInvitrogen (Carlsbad, CA, USA)
bFGFR&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
CalciumchloridSigma (Carlsbad, CA, USA)
CholeratoxinSigma (Carlsbad, Ca, USA)

<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
(DMEM)	
Endothelin-3 (ET-3)	Merck (Darmstadt, D)
Fötales Kälberserum (FKS).....	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)
Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS)	Life Technologies (Karlsruhe, D)
Insulin	Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)
L-15 Leibovitz-Medium.....	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)
Matrigel Matrix	BD Biosciences (Bedford, USA)
MCDB 153	Sigma (St. Louis, MO; USA)
Penicillin	Life Technologies (Karlsruhe, D)
Stammzellerfaktor (SCF).....	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

1.6 Zellkulturmedien, Medienzusätze, Puffer und Lösungen

Folgende Medien wurden für die Zellkultur verwendet:

Vollmedium für Melanomzellkultur	80% MCDB 153
	20% L-15 Leibovitz-Medium
	Insulin 1 µg/µl
	2 M Calciumchlorid
	2% FKS
	0,1% BSA
Melanozytenmedium	87% MCDB 153
	2% FKS
	10% cheliertes FKS
	2 mmol/l L-Glutamin
	20 pmol/l Choleratoxin
	150 pmol/l bFGF
	100 nmol/l ET3
	10 ng/ml SCF

Für Invasionsanalysen verwendete Medien:

Serumhaltiges Vollmedium	80% MCDB 153
	20% L-15 Leibovitz-Medium
	Insulin 1 µg/µl
	2 M Calciumchlorid
	2% FKS

	0,1% BSA
Serumfreies Medium	80% MCDB 153 20% L-15 Leibovitz-Medium Insulin 1 µg/µl 2 M Calciumchlorid 0,1% BSA
Lösungen und Puffer für den EMSA:	
Ammoniumpersulfat (APS)	100 mg APS-Feststoff 900 µl Aqua bidest
CSH (5x)	250 mM Tris; pH 7,4 1,25 M NaCl 5 mM EDTA H ₂ O
CSH-Puffer (1x)	200 µl CSH (5x) 150 µl Complete Inhibitor Stock (7x) 10 µl TritonX 100 10%-Stock 10 µl 0,5 M Na-vanadat 10 µl 10 mM EGTA 100 µl 0,5M NaF 520 µl Aqua bidest ad 1 ml
Laufpuffer	0,5-fach TBE
Natives Polyacrylamidgel (4%)	4% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 5-fach TBE in Aqua dest. APS 10% TEMED
TBE-Puffer (5x)	22,5 mM Tris-Borat 0,5 mM EDTA pH 8,0
TEN-Puffer (5x)	1 M Tris 0,5 M EDTA 0,5 M NaCl Aqua bidest
5x Ficoll-Puffer	20% Ficoll 400 (Sigma) 100 mM HEPES pH 7,6 300 mM KCl 10 mM DTT 0,1 mM PMSF Aqua bidest
10x-Bindepuffer	50% Glycerin 5 mM EDTA 0,25% Nonidet P40
Blotting-Puffer	0,25-fach TBE
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,3% Tween 20

	pH 7,5
Blockierungspuffer	Blocking stock solution (1:10) Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂ pH 9,5
CSPD-Lösung	CSPD-Stock 1:100 verdünnt mit Detektionspuffer

1.7 Antikörper

Bezeichnung	Appli- kation	Herkunft	Eingesetzte Konzentration
Anti-NFκB p65 (polyklonales Kaninchen-IgG, 2 µg/ ml)	EMSA	Santa Cruz Biotechnology INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:250
Anti-NFκB p50 (polyklonales Kaninchen-IgG, 2 µg/ ml)	EMSA	Santa Cruz Biotechnology INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:250
Anti NFκB p65 (polyklonales Kaninchen IgG, 200 µg/ ml)	WB	Santa Cruz Biotechnology INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:200
Anti-NFκB p50 (polyklonales Kaninchen IgG, 200 µg/ ml)	WB	Santa Cruz Biotechnology INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:200
Ziege Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugierter Zweitantikörper (2mg/ ml)	WB	Cell Signaling Technology, INC. (Danvers, MA, USA)	1:2.000
Maus Anti-β-Actin monoklonaler Antikörper (2mg/ ml)	WB	Sigma St. Louis, MO, USA)	1:4.000
Pferd Anti-Maus-IgG, HRP-konjugierter Zweitantikörper (2mg/ ml)	WB	Cell Signaling Technology, INC. (Danvers, MA, USA)	1:5.000

Tab. 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Abkürzungen: EMSA: *Electrophoretic mobility shift assay*; WB: Western-Blot.

1.8 Oligonukleotide

Die eingesetzten Decoy-Oligonukleotide wiesen eine NFκB-Bindungssequenz für alle Untereinheiten von NFκB auf. Als Kontrollen wurden Oligonukleotide mit einer unspezifischen Sequenz verwendet. Zur Erhöhung der Oligonukleotid-Stabilität innerhalb der Zelle, waren die verwendeten Oligonukleotide entweder an den 3'-Enden

über ein Kohlenstoffatom mit Digoxigenin (DIG) modifiziert oder sie hatten ein Phosphorothioat (PTO)-modifiziertes Rückgrat. Alle Decoy Oligonukleotide wurden über MWG-Biotech (Ebersberg, D) bezogen.

1.8.1 Decoy-Oligonukleotide mit NFκB-Bindungsmotiv

Bezeichnung	Modifikation	Sequenz
dcNFκB-fw	DIG 3'	AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC
dcNFκB-rw	DIG 3'	GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT
dcNFκB01fw	PTO	CCTTGAAGGGATTTCCTCC
dcNFκB01rw	PTO	GGAGGGAAATCCCTTCAAGG

Tab. 5: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten NFκB-Decoy-Oligonukleotide

1.8.2 Kontroll-Decoy-Oligonukleotide

Bezeichnung	Modifikation	Sequenz
C01κB-fw	DIG 3'	AGTTGAGCGCTCTTGAGCAGGC
C01κB-rw	DIG 3'	GCCTGCTCAAGAGCGCTCAACT
dcCTRL01fw	PTO	TTGCCGTACCTGACTTAGCC
dcCTRL01rw	PTO	GGCTAAGTCAGGTACGGCAA

Tab. 6: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Kontroll-Decoy-Oligonukleotide

1.8.3 Si-RNA

Die siRNA wurde von MWG-Biotech (Ebersberg, D) bezogen.

Bezeichnung	Typ	Sequenz
p65	Sense	GCCCUAUCCCUUUACGUCA
	Antisense	UGACGUAAAGGGAUAGGGC
CO3	Sense	GCGCAUUC CAGCUUACGUATT
	Antisense	UACGUAAGCUGGAAUGCGC
CO4	Sense	GCGCUAUCCAGCUUACGUA
	Antisense	UACGUAAGCUGGAUAGCGC

Tab. 7: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten siRNA

Sie wurden mit 3'-Überhängen hergestellt, die aus zwei Uracilnukleotiden in DNA-Bindung bestanden (dUdU).

1.8.4 Primer und Sonden für die Echtzeit-PCR

1.8.4.1 Primer für die SYBR Green I basierte Echtzeit-PCR

Alle Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, D) erworben.

Bezeichnung	Typ	Sequenz
65p0288fw	forward	CTGCCGGGATGGCTTCTAT
65p0378rw	reverse	CCGCTTCTTCACACACTGGAT
8IL0220f	forward	ACTCCAAACCTTTCCACCC
8IL0379r	reverse	AAAACTTCTCCACAAACCTC
HPRT-P1f-517fw	forward	GACTTTGCTTTCCTTGGTCA
HPRT-P1r-739rw	reverse	GGCTTTGTATTTTGCTTTTCC

Tab. 8: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer für SYBR Green I PCR

1.8.4.2 Primer und Sonden für die Sonden-basierte Echtzeit-PCR

Bezeichnung	Typ	Sequenz
<u>IL-8</u>		
Primer	forward	AGACAGCAGAGCACACAAGC
	reverse	CACAGTGAGATGGTTCCTTCC
Sonde		GCCAGGAA
<u>IL-1β</u>		
Primer	forward	CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA
	reverse	TTGGGTAATTTTGGGATCTACA
Sonde		AGCTGGAG
<u>HPRT</u>		
Primer	forward	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC
	reverse	CGAGCAAGACGTTCACTCCT
Sonde		GCTGAGGA

Tab. 9: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer und Sonden für die Sonden-PCR

Die verwendeten Sonden waren LNA-modifiziert und entstammten dem Universal Probe Library-System der Firma Roche.

1.9 Materialien für Transfektionsversuche

Lipofectamine RNAiMAX ReagentInvitrogen (Carlsbad, CA, USA)
 Oligofectamine ReagentInvitrogen (Carlsbad, CA, USA)
 OptiMEM MediumInvitrogen (Carlsbad, CA, USA)

1.10 Materialien für ELISA

Dithiothreitol (DTT)
 Protease Inhibitor Cocktail
 Complete Lysis Buffer
 Binding Buffer 10x Wash Buffer
 10x Antibody Binding Buffer
 Developing Solution
 Stop Solution
 96-well Microtiter-Platte

Die aufgelisteten Materialien waren in den von Actif Motive (Rixensart, B) bezogenen Kits TransAM NFκB p65 Transkription Factor Assay Kit und TransAM NFκB p50 Transkription Factor Assay Kit enthalten.

1.11 Materialien für Western-Blot

Aqua ad injectabilia.....Delta Select (Pfullingen, D)
 Bovines Serum Albumin (BSA)New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
 ECL Plus Western Blotting Detection.....Amersham Biosciences (Little Chalfont, Reagents UK)
 Ethylene glycol bis(2-aminoethylether)-Sigma (St. Louis, MO, USA)
 N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)
 Hyperfilm ECL.....Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK)
 Methanol.....Merck (Darmstadt, D)
 Natriumchlorid.....Sigma (St. Louis, MO, USA)
 NatriumfluoridSigma (St. Louis, MO, USA)
 NatriumvanadatSigma (St. Louis, MO, USA)
 NuPage AntioxidantInvitrogen (Carlsbad, CA, USA)

NuPage 4-12% Bis Tris Gel 1-200 kDa	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPage LDS Sample Buffer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPage MES SDS Running Buffer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPage Transfer Buffer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PBS Medium.....	Apotheke Innenstadt Uni München
Protease Inhibitor Cocktail Tablet	Roche (Basel, Schweiz)
Complete, Mini, EDTA-free	Roche (Basel, Schweiz)
PVDF Filterpapier Sandwich	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
See Blue Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Tris	Serva (Heidelberg, D)
Tris-Borat.....	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Triton X-100.....	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Tween 20.....	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Western Blocking Solution	Roche (Basel, CH)

1.12 Materialien für die indirekte Immunfluoreszenz

Dig Wash and Block Buffer Set.....	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
FKS	FAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)
Mounting Medium	Dako (Hamburg, D)
Objektträger Falcon Culture Slide 4 Chamber	Becton Dickinson Labware
.....	(Franklin Lakes, NY, USA)
Paraformaldehyd	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Triton x 100.....	Sigma (St. Louis, MO, USA)

1.13 Materialien für die Reverse Transkription

Desoxyribonukleosid-Triphosphate	Roche (Basel, CH)
(dNTPs)	
DTT	Roche (Basel, CH)
Expand Reverse Transkriptase	Roche (Basel, CH)
<i>First strand buffer</i>	Roche (Basel, CH)
Recombinant RNasin Ribonuclease	Promega (Madison, WI, USA)

1.14 Kommerzielle Komplettsysteme

BCA Protein Assay Kit	Pierce (Rockford, IL, USA)
Diff-Quick-Färbekit	Medion Diagnostics (Düdingen, CH)
Dig Wash and Block Buffer Set.....	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Expand Reverse Transkriptase	Roche (Basel, CH)
Light Cycler Taq Man Master	Roche (Basel, CH)

LightCycler FastStart DNA Plus SYBRRoche (Basel, CH)
 Green I
 TransAM NFκB p65, Transkription FactorActive Motif (Rixensart, B)
 Assay Kit
 TransAM NFκB p50, Transkription FactorActive Motif (Rixensart, B)
 Assay Kit

1.15 Einwegartikel

Serologische Kunststoffpipetten 5, 10, 25 ml .Greiner (Frickenhäusen, D)
 Serologische KunststoffreaktionsgefäßeEppendorf (Hamburg, D)
 (1,5 ml; 2 ml)
 Serologische KunststoffreaktionsgefäßeFalcon (Heidelberg, D)
 (15 ml; 50 ml)
 Filterpapier 3MMWhatman (Maidstone, UK)
 Nylonmembran, positiv geladenRoche Diagnostics (Mannheim, D)
 ObjektträgerSchubert und Weiss (München, D)
 Pasteurpipetten.....Brand (Wertheim, D)
 PCR Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml)Pipetlab (Erlangen, D)
 Pipettenspitzen (gestopft)Pipetlab (Erlangen, D)
 (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000µl)
 Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)Amersham (Braunschweig, D)
 Sterilfilter (0,2 µm; 0,45 µm).....Schleicher & Schuell (Dassel, D)
 Transwell InsertsBD Biosciences (Bedford, USA)
 Zellkulturflaschen (Fläche 75 cm²)Nunc (Wiesbaden, D)
 Zellkulturlochplatten (6-; 24-Well).....Nunc (Wiesbaden, D)
 ZellschaberCostar (Bodenheim, D)

1.16 Geräte

Axiovert 25 Mikroskop.....Zeiss (Jena, D)
 CO₂-Inkubator (Heracell)Heraeus (Hanau, D)
 ELISA-Reader.....MWG Biotech (Ebersberg, D)
 Elektrophoresekammern und ZubehörBiorad (München, D)
 Entwicklungsgerät X-Omat.....Kodak (Rochester, NY, USA)
 Fluoreszenzmikroskop (Axioskop)Zeiss (Jena, D)
 Gefrierschränke:
 -30°CBosch (Stuttgart, D)

-80°C	Hierhammer Kältetechnik (München, D)
PCR Gerät Lightcycler	Roche (Basel, CH)
Photometer (SmartSpec 3000).....	Bio-Rad (München, D)
Schwenker (Swip-KL2)	Bühler (Hechingen, D)
Sterilwerkbank (Herasafe).....	Heraeus (Hanau, D)
Tischzentrifuge (5415C).....	Eppendorf (Hamburg, D)
Tischzentrifuge, gekühlt (5415R)	Eppendorf (Hamburg, D)
UV-Crosslinker.....	Amersham (Braunschweig, D)
Vortex Genie 2.....	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Zentrifuge, mitteltourig, gekühlt (RC5B)	Sorvall (Bad Homburg, D)
Zentrifugenrotoren (F16/250; SS34)	Sorvall (Bad Homburg, D)

1.17 Software

LightCycler Software Version 5.32	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
---	---------------------------------

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit Hilfe des Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) kann die Aktivierung von NFκB untersucht werden.

Dazu werden zunächst Kernextrakte mit doppelsträngigen Oligonukleotiden inkubiert. Die Oligonukleotide weisen dabei eine Bindungsstelle auf, an die alle NFκB-Untereinheiten binden können (sog. NFκB-Konsensussequenz). Damit wird aktiviertes NFκB statt an die Kern-DNA an die doppelsträngigen Oligonukleotide gebunden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Dabei zeigen die entstandenen DNA-Protein-Komplexe aufgrund ihres höheren Molekulargewichts gegenüber der ungebundenen Sonde ein langsames Wanderungsverhalten im Gel. Dies ergibt, je nach Molekulargewicht, retardierte Banden, welche im Anschluss autoradiographisch visualisiert werden.

Das Prinzip der Gelretardation ist in Abbildung 9 veranschaulicht.

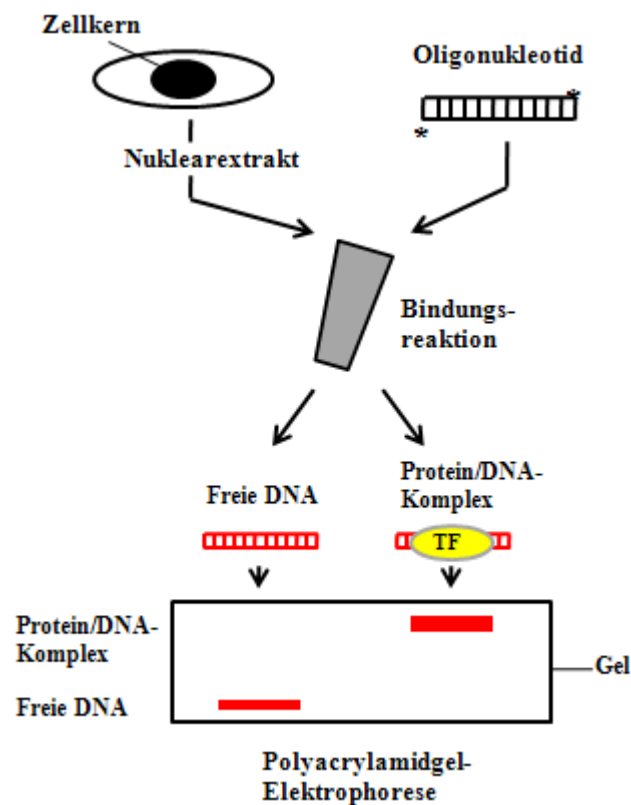


Abb. 9: Schematische Darstellung des Gelretardationsexperimentes

Kernextrakte werden mit radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden inkubiert, die eine Bindungssequenz für den Transkriptionsfaktor NFκB besitzen. Das Reaktionsgemisch wird anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel autoradiographiert. Die gebildeten Protein/ DNA-Komplexe zeigten im Polyacrylamid-Gel gegenüber freier, nicht gebundener DNA ein langsames Wanderungsverhalten. Modifiziert nach Knippers 1995.¹⁸⁰

2.1.1.1 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Doppelsträngige Oligonukleotide, welche eine Konsensussequenz für NFκB oder eine unspezifische Sequenz enthielten, wurden aus komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotiden (Materialienteil 1.8.1, 1.8.2) von jeweils 20 bis 22 bp Länge, synthetisiert. Da Oligonukleotide in der Regel rasch durch Endo- und Exonukleasen in der Zelle abgebaut werden, können sie zum Schutz gegen Abbau modifiziert und damit stabilisiert werden. Damit wird die Effizienz der Oligonukleotide erhöht, da sich diese folglich über einen längeren Zeitraum und in höheren Konzentrationen in der Zelle befinden.

Eine solche Stabilisierung ist durch den Einsatz chemisch modifizierter Internukleosidbindungen möglich. Zur Stabilitätserhöhung waren die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide entweder am 3'-Ende an Digoxigenin (DIG) gebunden oder sie enthielten ein Phosphorothioat (PTO)-modifiziertes Rückgrat.

Die kommerziell bezogenen einzelsträngigen Oligonukleotide (ODNs) wurden zunächst in entsprechender Menge Wasser (Endkonzentration von 100 μM) 15 min bei Raumtemperatur gelöst. Für die Aneinanderlagerung der einzelsträngigen ODNs (=Annealing) wurden jeweils 40 μl der einzelsträngigen ODNs mit 20 μl 5x TEN-Puffer gemischt (Endkonzentration 40 μM). Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei 95° C inkubiert, anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und auf Eis gelagert. Für die Verwendung der Oligonukleotide in Gelretardationsexperimenten, wurden diese auf 1:1.000 verdünnt.

Dazu wurden 40 μl der *sense* und der *antisense* Oligonukleotide in einer Konzentration von 100 μM in 20 μl 5 x TEN-Puffer gemischt und für 10 min auf 95° C erhitzt. Beim langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur um etwa 1° C pro Minute erfolgte die Anlagerung (*Annealing*) der komplementären Stränge. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20° C.

2.1.1.2 Herstellung der DNA-Sonden für Gelretardations-Assays

Die radioaktive Markierung der doppelsträngigen Oligonukleotide (dsODNs) am 5'OH-Ende erfolgte mit dem Betastrahler ^{32}P in Form von γ -(^{32}P)-markiertem ATP. Der Transfer von ^{32}P vom ATP-Molekül an die 5'-Enden des Oligonukleotids erfolgte durch das Enzym T₄-Polynukleotidkinase.

Der Markierungsansatz (50 μl) wurde auf Eis hergestellt und bestand aus folgenden Komponenten:

- 2 μl dsNF κ B-Oligonukleotide
- 2 μl T₄-Polynukleotid-Kinase
- 5 μl 10x Kinasepuffer
- 5 μl γ -(^{32}P)-dATP
- 36 μl H₂O

Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37° C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule zur Aufreinigung 4 min bei 5.000 Upm abzentrifugiert.

2.1.1.3 Durchführung der Gelretardations-Experimente

Der EMSA wurde mit Zellkernextrakten aus Melanomzellen und Melanozyten durchgeführt. Dazu wurde 10 μg Zellkernproteinextrakt in einem eisgekühlten Reaktionsansatz von 25 μl Volumen eingesetzt. Der Ansatz enthielt außerdem 1 μl γ -(^{32}P) markiertes Oligonukleotid, 2 μl BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 μl Puffer D+, 4 μl 5x Ficoll Puffer, 4 μl H₂O und 2 μl poly dI/dC-Polymere (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Letztere dienen zum Abfangen

unspezifisch an Konsensus-DNA bindender Proteine. Während der 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur sollte die Bildung der DNA/ Protein-Komplexe stattfinden. Zum Spezifitätsnachweis der DNA/ NF κ B-Bindung wurde vor Zugabe der radioaktiven Sonde, ein identisches, nicht radioaktiv markiertes, doppelsträngiges Oligonukleotid in 300-fachem Überschuss hinzupipettiert.

Für die Elektrophorese wurde ein nicht-denaturierendes 4%-iges Polyacrylamid-Gel verwendet. Zur Herstellung des Gels wurden 48 ml Aqua dest. in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt und unter ständigem Rühren 6 ml 40% Acrylamid, 6 ml 5-fach TBE-Puffer und 400 μ l APS 10% als Radikalstarter sowie 40 μ l TEMED als Radikalstabilisator hinzugegeben. Das Gel wurde zwischen zwei 14x15 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Abstandhaltern gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach Polymerisieren der Gellösung wurden Abstandhalter und Kamm entfernt und die Taschen mit Wasser ausgespült. Die Gelplatten wurden senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur gespannt und die beiden Kammern der Apparatur wurden mit 0,5-fachem TBE-Puffer befüllt. Zunächst wurde in die äußerste Geltasche der Marker Bromphenolblau aufgetragen. Nachdem dieser bei einer Spannung von 100 Volt 1 cm weit gelaufen war, wurden die restlichen Geltaschen mit den Reaktionsansätzen beladen. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei einer Spannung von 200 V bis die Markenbande 10 cm gelaufen war. Das Gel wurde auf einem 3MM Whatman-Papier fixiert und für 60 min bei 80° C unter Vakuum getrocknet. Danach wurde es in einer Kassette mit einem Röntgenfilm bei -80° C für 24 h exponiert und mit Hilfe eines Kodak XAR-5 Films autoradiographiert.

2.1.1.4 Supershift-Experimente

Zur Identifikation bestimmter Untereinheiten von NF κ B wurden Supershift-Experimente durchgeführt. Dabei sollte die Zugabe von Antikörpern und ihre Bindung an eine bestimmte Untereinheit von NF κ B die zusätzliche Retardierung des entsprechenden DNA-Protein-Komplexes einen sogenannten 'supershift' der Bande bewirken.

Bei Bindung des Antikörpers direkt an die DNA-bindende Domäne der NF κ B-Untereinheit kann es auch zu einer Aufhebung der DNA-Protein-Interaktion kommen.

Zwei Stunden vor Zugabe der radioaktiv markierten Sonde wurden jeweils 2 μ l einer Antikörperlösung in einer Konzentration von 100 μ g/ml mit den Zellkernproteinen inkubiert.

Es wurden polyklonale IgG-Kaninchenantikörper gegen die NF κ B-Untereinheiten p50 und p65 eingesetzt (siehe Materialenteil 1.7).

2.2 Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren

2.2.1 DNA-Aufreinigung durch Phenolextraktion und DNA-Fällung für Stabilitätsuntersuchungen

Sobald Oligonukleotide in die Zellen aufgenommen werden, können diese durch Exo-beziehungsweise Endonukleasen abgebaut werden. Um die Stabilität der Oligonukleotide innerhalb der transfizierten Zellen zu untersuchen, wurden diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion aus den Zellen isoliert und anschließend über die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) analysiert. Die Auftrennung der DNA mittels PAGE erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Ladung, wobei kürzere ODNs beziehungsweise ihre Fragmente weiter wandern als längere.

Die verwendeten dsODNs waren am Rückgrat mit Phosphothioat (PTO) modifiziert sowie am 3'-Ende mit Digoxigenin (DIG) markiert.

Für Stabilitätsanalysen wurden Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen bei einer Ausgangszellzahl von 50.000 kultiviert. 24 h, 48 h beziehungsweise 72 h nach Transfektion mit den dsODNs wurden die Zellen geerntet und pelletiert.

Zur Abtrennung der an der Zelloberfläche verbliebenen Oligonukleotide, wurden die Pellets zunächst mit 0,5 M NaCl und 0,2 M Essigsäure für 10 min bei 4° C inkubiert. Diesem folgte ein dreimaliges Waschen in PBS. Zur Zellyse wurden die Pellets in 200 µl PBS aufgenommen und mit 200 µl Lysepuffer AL (DNeasy Q-Kit) sowie 20 µl Protease K (10 mg/ml) versetzt. Nach kräftigem Mischen, wurde der Ansatz 10 min lang bei 70° C im Heizblock inkubiert.

Für die Aufreinigung der DNA wurde das proteinhaltige Gesamtzelllysats mit gleichem Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) versehen. Die Phasentrennung wurde durch Mischung und Zentrifugation (5 min, 14.000 Upm, 4° C) beschleunigt, wobei Proteine denaturiert wurden und wegen ihrer teilweise hydrophoben Seitenketten in der Interphase zwischen phenolischer und wässriger Phase verblieben. Nach Abnahme der oberen, hydrophilen und DNA-haltigen Phase, wurde diese zur Phenolentfernung mit gleichen Volumen Chloroform versehen und erneut zentrifugiert. Darauf folgte die Ethanolfällung. Hierbei wurde die obere, wässrige Nukleinsäurephase erneut abgenommen und mit 1/10 Volumen 4 M Lithiumchloridlösung sowie mit 2,5-fachem Volumen 70% Ethanol versetzt und durch Zentrifugation (30 min, 14.000 Upm, 4° C) ausgefällt und pelletiert. Die Pellets wurden unter dem Abzug 15 min luftgetrocknet und daraufhin in 10 µl H₂O aufgelöst. Die Aufbewahrung der Nukleinsäurepellets bis zur elektrophoretischen Analyse erfolgte bei -80° C.

Die Auftrennung der dsODNs mittels PAGE erfolgte analog zum EMSA in einem 16%-igen Polyacrylamidgel. Es wurde die absolute DNA-Menge der kultivierten Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h analysiert. Eine Normalisierung bezüglich der Zellzahl wurde dabei nicht durchgeführt.

2.2.2 RNA-Isolation mit Trizol

Zur RNA-Extraktion wurden etwa 100.000 Zellen in einer 3,5 cm² großen Zellkulturschale (etwa 80% konfluent) zweimal mit HBSS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trizol direkt auf den Zellrasen pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Während der 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Lyse der Zellen. Das zähflüssige Lysat wurde mit dem Schaber vom Boden gelöst, zum Rand gestrichen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde bis zur Weiterverwendung bei -70° C gelagert.

Nach einem ca. 5-minütigen Auftauen bei Raumtemperatur wurde zu den Trizol-Lysaten 200 µl Chloroform gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden nun kräftig von Hand geschüttelt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entmischung der Phasen wurde durch Zentrifugation (15 min, 14.000 Upm, 4° C) beschleunigt und führte zur Bildung einer unteren roten Phenol/Chloroform-haltigen Phase mit DNA und Protein sowie einer oberen farblosen wässrigen Phase mit RNA. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen (ca. 400 µl) und in ein neues Gefäß überführt. Zur RNA-Fällung wurde zur abgenommenen RNA-haltigen Phase gleiches Volumen Isopropanol 100% zugegeben. Nach kräftigem Mischen und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA abzentrifugiert (15 min, 14.000 Upm, 4° C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit jeweils 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol 15 min bei 14.000 Upm und 4° C gewaschen. Es folgte die Abnahme des Überstandes sowie die Trocknung des Pellets unter dem Abzug 5-10 min. Anschließend wurde die RNA in 30 µl DEPC - behandeltem Wasser bei 4° C über 2-3 h gelöst. Durch die Behandlung mit DEPC war dieses Wasser RNase-inaktiviert und diente damit der Vorbeugung einer Kontamination mit RNAsen. Während des Lösungsvorgangs wurde die RNA alle 30 min gevortext und schließlich über Nacht bei -70° C gelagert.

2.2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Extinktion beziehungsweise Absorption. Diese Relation macht man sich bei der spektralphotometrischen Quantifizierung von wässrigen Nukleinsäurelösungen zunutze.

Von einer 1:20 Verdünnung der gereinigten RNA wurde im Photometer die Absorption bei 260 nm (entspricht dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) bestimmt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten. Einer OD_{260} von 1 entspricht 40 µg/ml RNA.

2.2.4 Synthese der cDNA durch Reverse Transkription

Während der reversen Transkription wurde von einer RNA-Matrize ausgehend, einzelsträngige *copy*-DNA (cDNA) erzeugt. Für die Reverse Transkription wurde das *Expand Reverse Transkriptase Kit* der Firma Roche verwendet. Die Synthese der komplementären cDNA erfolgt in 5'-3'-Richtung und benötigt für die Initiation einen Primer. Als Primer wurden Poly-(dT)₁₅-Oligos eingesetzt, Oligomere von 15 Nukleotid-Länge, die an die Polyadenylierungssequenz (Poly-(A)-Kette) am 3'-Ende der RNA binden.

Zur Primerhybridisierung wurde 1 µg der gewonnenen RNA mit DEPC-Wasser ad 8,5 µl verdünnt und mit 2 µl Oligo-dT-Primern gemischt. Der Ansatz wurde 10 min bei 65° C inkubiert und daraufhin sofort auf Eis gelagert.

Bei einem Endvolumen von 10,5 µl der mit Primern versehenen RNA, wurde nun der Ansatz für die reverse Transkription auf Eis pipettiert. Dieser setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

- 10,5 µl RNA
- 4 µl Expand Reverse Transkriptase Puffer
- 2 µl 100 mM DTT
- 2 µl dNTP [10 mM]
- 0,5 µl *RNasin*
- 1 µl Expand Reverse Transkriptase

Die Umschreibung erfolgte bei 42° C bei einer Dauer von 60 min. Die cDNA wurde anschließend mit DEPC-Wasser im Verhältnis von 1:3 verdünnt und bei -80° C gelagert.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.5.1 Allgemeines Prinzip der PCR

Das Verfahren der PCR ermöglicht es, einen definierten DNA-Abschnitt sequenzspezifisch zu vervielfältigen. Die definierte, zu amplifizierende cDNA-Matrize wird hierbei auch als *Template*-DNA bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und zweier sequenzspezifischer Oligonukleotid-

Primer, die den Enden der *Template-DNA* homolog sind. Es werden bei der Amplifikation immer wieder drei Schritte durchlaufen, die jeweils allein durch die Wahl der Temperatur gesteuert werden können: (1.) Durch Erhitzen werden die beiden Stränge der Matrizen-DNA aufgeschmolzen, indem Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren gelöst werden (Denaturierung). (2.) Durch Senken der Temperatur erfolgt die spezifische Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige *Template-DNA* (Anlagerung). (3.) Durch die Erhöhung der Temperatur auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase werden die Primer schließlich verlängert (Elongation). Das so synthetisierte DNA-Stück kann bei Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte (Zyklus) als Matrize für einen neuen Primer dienen. Dies führt zu einer exponentiellen Anreicherung des DNA-Abschnittes mit jedem weiteren Zyklus, wodurch aus einer sehr kleinen Menge vorgegebener DNA, große Mengen einer beliebigen DNA-Sequenz hergestellt werden können, die anschließend weiter analysiert werden können.

2.2.5.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die PCR wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression bestimmter Gene treffen zu können. Mittels der konventionellen PCR ist eine Quantifizierung nur möglich, solange sich die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase der Amplifikation befindet. In der Plateauphase der PCR-Reaktion lässt sich ein ursprünglicher Mengenunterschied der entsprechenden DNA-Matrize oft nicht mehr feststellen, da die Plateauphase bei jeder PCR-Reaktion unterschiedlich schnell erreicht wird und deshalb nur sehr schwer überprüft werden kann. Dazu müsste man nach jedem PCR-Zyklus eine Probe aus der Reaktion entfernen und zur Quantifizierung die PCR-Fragmente gelelektrophoretisch auftrennen, ohne dabei die Bedingungen der PCR-Reaktion zu beeinflussen. Diese Überprüfung wird überflüssig, wenn die amplifizierte DNA-Menge während der PCR im Reaktionsansatz analysiert werden kann. Dies ist mittels der Echtzeit-PCR in einem LightCycler Gerät (Firma Roche) möglich.

Das LightCycler Gerät besteht im Wesentlichen aus einem PCR-Gerät mit einer optischen Einheit, mit welcher eine fluoreszenzbasierte Detektion der PCR-Produkte möglich ist.¹⁸¹

Vor Beginn der PCR-Reaktion wird zu jeder Probe der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green hinzugefügt, welcher sich nur in doppelsträngige DNA einlagern kann. Nach jeder Elongationsphase werden sich in Glaskapillaren befindende Proben mit einem Laser zur Abgabe von Fluoreszenz angeregt. In DNA eingelagertes SYBR Green emittiert in der Folge, proportional zur amplifizierten DNA-Menge, ein Fluoreszenzsignal, welches über ein System aus Spiegeln und

wellenlängenspezifischen Leitern an ein Fluorimeter weitergeleitet wird. Dort erfolgt dann die Umwandlung des optischen Signals in ein elektrisches Signal, welches zum PC weitergeleitet wird.

Der Anstieg der gemessenen Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus steht in direktem Verhältnis zur Produktkopienzahl-Akkumulation. Sie wird direkt im PCR-Reaktionsgefäß gemessen. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, kann schließlich auf die Ausgangsmenge der zu untersuchenden cDNA zurückgeschlossen werden.

Um quantitative Aussagen der mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines sogenannten Referenzgens bezogen, welches in jeder Probe zusätzlich mitbestimmt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen das Gen für die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) verwendet. HPRT wird in den meisten Zellen nicht reguliert und kann so als Referenz über die eingesetzte cDNA dienen.

Durch die Mitführung einer Verdünnungsreihe bekannter Ausgangskonzentration, wurde für jedes Gen eine Standardkurve erstellt, aus deren Linearität Aussagen über die Amplifikationseffizienz getroffen werden konnten. Darüber hinaus wurde stets eine Probe mit H₂O anstelle der cDNA als Negativkontrolle mitgeführt.

2.2.5.2.1 Detektion der PCR-Produkte mittels SYBR Green I

Die Visualisierung des Amplikons erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit zwei verschiedenen Fluoreszenz-Detektionssystemen: dem nicht sequenzspezifischen SYBR Green I-System oder dem Sonden-PCR-System, welches sequenzspezifisch ist. Bei SYBR Green I handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der die Eigenschaft besitzt, in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Liegt der Farbstoff frei in Lösung vor, liegt keine oder nur sehr geringe Fluoreszenz vor. Erst durch Interkalierung des Farbstoffs in die kleine Furche der dsDNA bei der Elongation am Ende eines PCR-Zyklus, steigt das Fluoreszenzsignal um ein Vielfaches. Die messbare Fluoreszenz ist damit direkt proportional zur vorhandenen doppelsträngigen DNA.¹⁸²

Da sich das SYBR Green I jedoch nicht nur in das korrekte PCR-Produkt sondern auch in Artefakte einlagern kann (so z.B. in Primerdimere), ist eine klare Differenzierung zwischen Artefakt und Zielfragment notwendig. Diesem Umstand wirkt man mit der Schmelzpunktanalyse des Produkts entgegen, die am Ende der PCR durchgeführt wird. Hier geht man von der Tatsache aus, dass jedem doppelsträngigen DNA-Fragment eine charakteristische Schmelztemperatur (T_m) zugeordnet werden kann. Dazu wird das PCR-Reaktionsgemisch in 1° C Temperaturschritten bis zu einer Endtemperatur von 95° C erhitzt und dabei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Wird die für das Produkt spezifische T_m erreicht, denaturiert der Doppelstrang. Es

kommt es zu einem steilen Abfall der Fluoreszenz (Peak), da der interkalierende Farbstoff von der einzelsträngigen DNA dissoziiert. Im LightCycler wird die Schmelzkurve als negative Steigung der Fluoreszenzkurve (1. Ableitung) dargestellt, sodass der Peak der Schmelzkurve der Temperatur entspricht, bei der der stärkste Intensitätsabfall der Fluoreszenz stattfindet. Werden mehr als eine T_m registriert, müssen neben dem spezifischen Produkt Artefakte vorliegen. Zwar erhöht dies die Spezifität des Verfahrens, andererseits ist eine Quantifizierung nur ohne Artefakte möglich.

Zur Durchführung der SYBR Green I-PCR wurden pro Ansatz 1 µl Primer *forward* [10 µM], 1 µl Primer *reverse* [10 µM], 4 µl Fast Start Master SYBR Green I und 8 µl steriles H₂O als Master Mix vorbereitet. Zu jeweils 14 µl des Master Mix wurden 6 µl der *Template-cDNA* in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Vorgekühlte Glaskapillaren wurden mit dem Reaktionsgemisch befüllt und nach Zentrifugation über 30 sec bei 1.000 Upm in das LightCycler Instrument überführt.

Die Bedingungen der PCR-Prozedur sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Programmschritt	Zyklen	Segment	Temperatur(°C)	Zeit
Präinkubation	1		95	15 min
Amplifikation	40	Denaturierung	95	15 sec
		Anlagerung	50 ¹	25 sec ²
		Verlängerung	72	15 sec
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	30 sec
		Anlagerung	50	1 sec
		Schmelzen	95	0 sec
Kühlen	1		30	10 min

Tab. 10: PCR-Protokoll SYBR Green I (exemplarisch für das HPRT-Gen)

¹ 55° C für das IL-8-Gen;

² 12 sec für das IL-8-Gen

Die Auswertung der Experimente erfolgte mit der LightCycler Software Version 5.32 der Firma Roche.

2.2.5.2.2 Detektion der PCR-Produkte mittels Hybridisierungs-Sonden

Das Prinzip der Sonden-PCR beruht darauf, dass zur PCR-Reaktion eine Sonde mit einer zum amplifizierenden Fragment komplementären Sequenz gegeben wird. In der

vorliegenden Arbeit wurde die sogenannte Double-Dye-Sonde verwendet. Sie zeichnet sich durch zwei Fluorochrome aus. Fluorophor 1, ein Reporterfluorochrom befindet sich am 5'-Ende, Fluorophor 2, ein Quencher (engl.: to quench = löschen) am 3'-Ende der Sonde. Zusätzlich ist das 3' Ende phosphoryliert, wodurch verhindert wird, dass die Sonde bei der Elongation als Primer fungiert. Solange die Sonde intakt ist, ist die Emission gering, da fast die gesamte Lichtenergie des Reporters aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher von diesem aufgenommen wird (Fluorescence Resonance Energie Transfer, FRET).¹⁸³ Während der Elongationsphase wird die Sonde infolge der 5'-3'Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase degradiert. Dadurch ist die Nähe zwischen Reporterfluorochrom und Quencher aufgehoben und es kommt zur Fluoreszenz. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zur wachsenden Menge der amplifizierten DNA.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten spezifischen Sonden sowie die Sequenzen der Primer für das entsprechende Gen wurden mit Hilfe der Software unter <http://www.universalprobelibrary.com> zusammengestellt und von der Firma Roche bezogen. Die Sonden waren LNA (*locked nucleic acid*)-modifiziert. LNAs sind Nukleinsäuren in welchen der Zuckeranteil chemisch modifiziert ist. Es handelt sich hierbei um eine bicyclische Furanoseeinheit, die in einer RNA-ähnlichen Zuckerkonformation fixiert (*locked*) ist. LNAs binden mit besonders hoher Affinität an DNA, was eine hohe Schmelztemperatur zur Folge hat. Die eingesetzten LNA-Sonden wiesen bei einer Länge von 9 Nukleotiden eine ähnliche Hybridisierungstemperatur wie die unmodifizierten, etwa 20-25 Nukleotide langen Primer auf. LNA-Sonden binden aufgrund ihrer Kürze relativ oft im Genom, dadurch ist die Analyse aller menschlichen Gene mit einem System von etwa 100 verschiedenen Sonden möglich. Durch das Zusammenspiel der spezifischen Primer mit der Sonde ist aber eine hohe Spezifität der Reaktion gewährleistet.¹⁸⁴

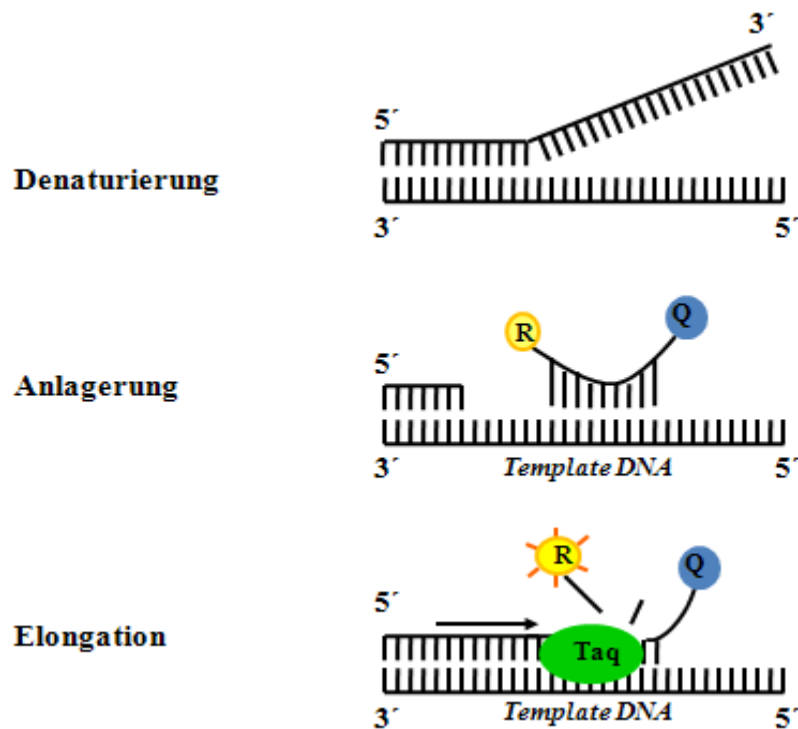


Abb. 10: Schematische Darstellung der eingesetzten Sonden-PCR

Bei den Double-Dye-Sonden befinden sich zwei verschiedene Fluorochrome auf einer Sonde. Der Reporter befindet sich am 5'-Ende, der Quencher am 3'-Ende. Ist die Sonde intakt, ist die Fluoreszenz des Reporters sehr gering, da fast die gesamte Lichtenergie vom Quencher absorbiert wird. Während der Elongationsphase tritt die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert diese. Die nicht mehr bestehende räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter führt zu einer Fluoreszenz, die proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

Für die Reaktion wurde pro Ansatz ein Reaktionsgemisch vorbereitet, der wie folgt zusammengesetzt war:

- 0,2 µl *forward* Primer [200 nM]
- 0,2 µl *reverse* Primer [200 nM]
- 0,1 µl Sonde [100 nM]
- 4,5 µl H₂O
- 2,0 µl 5x Mastermix

Zu jeweils 7 µl des PCR-Reaktionsgemisches wurden 3 µl cDNA gegeben. Der Reaktionsansatz wurde in vorgekühlte Glaskapillaren pipettiert und bei 1.000 Upm für 30 sec herunterzentrifugiert. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend in das LightCycler-Gerät übergeführt. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 11 dargestellt.

Programmschritt	Zyklen	Segment	Temperatur (°C)	Zeit (sec)
Präinkubation	1		95	600
Amplifikation	40	Denaturierung	95	10
		Anlagerung	60	30
		Verlängerung	72	1

Tab. 11: PCR-Protokoll der Sonden-PCR

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Konzentration von Gesamtzell- und Kernproteinen

Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung des BCA-Protein-Assay-Kits der Firma Pierce bestimmt. Diese basiert auf der Reduktion von zweiwertigem Kupfer zu einwertigem Kupfer (Biuret Reaktion) durch Proteine. Das einwertige Kupfer bildet mit Bicinchromsäure (BCA) einen violett gefärbten Komplex, der photometrisch quantifiziert werden kann.

Vor dem Versuch wurde zunächst eine BCA-haltige Lösung (Reagent A) mit einer Kupfer(II)-haltigen Lösung (Reagent B) im Verhältnis 50:1 gemischt. Zu 1 ml dieser Mischung wurden 10 µl Gesamtproteinlösung beziehungsweise 5 µl Kernproteinlösung gegeben und etwa 20 min bei Raumtemperatur sowie anschließend 10 min bei 37° C inkubiert. Durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm wurde die Absorption bestimmt und, anhand der Absorption einer Verdünnungsreihe mit BSA, quantifiziert.

2.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Die Analyse aktiver p50- beziehungsweise p65-Untereinheiten von NFκB erfolgten über ELISA (*solid-phase-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*). Der Boden der für die Analysen zur Verfügung stehenden 96-well-Microtiter-Platte war dabei mit immobilisierten, doppelsträngigen Oligonukleotiden beschichtet, welche eine Konsensussequenz für NFκB (5'-GGGACTTTCC-3') enthielten. In einem ersten Schritt wurde jeweils 10 µg Zellkernprotein in die Wells gegeben, das zuvor mit *Complete Lysis Buffer* ad 20 µl verdünnt wurde. Als Positivkontrolle wurde der vom Hersteller mitgelieferte Kernproteinextrakt der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji verwendet. Ein weiteres Well diente der Bestimmung unspezifischer Färbung. Dieses enthielt lediglich *Complete Lysis Buffer* ohne Protein.

Während 1 h Inkubation bindet aktiviertes NFκB spezifisch an die immobilisierten, doppelsträngigen Konsensus-Oligonukleotide der Microtiterplatte. Nicht gebundenes

Protein wurde in drei Waschschritten, bei welchen jedes Well mit 200 µl Waschpuffer gewaschen wurde, entfernt. Die Detektion der an die immobilisierten DNA-Sequenzen gebundenen NFκB-Untereinheiten erfolgte mit Antikörpern gegen p50 oder p65 (1:1.000 Verdünnung in 1x *Antibody Binding Buffer*). Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur und 3 weiteren Waschschritten (siehe oben), wurde ein zweiter, HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelter Antikörper (1:1.000 Verdünnung in 1x *Antibody Binding Buffer*) hinzugegeben, worauf eine weitere Inkubation von 1 h folgte. Dem folgten vier weitere Waschschrritte (siehe oben). Nach Zugabe von 100 µl Entwicklungslösung zu jedem Well wurde die Mikrotiterplatte unter Lichtausschluss 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung beendet und am ELISA-Reader quantitativ über den Vergleich mit der Positivkontrolle ausgewertet. Die Proben wurden in Dreifachansätzen analysiert.

2.3.3 Western-Blot-Analysen

Die Western-Blot-Analyse ist eine Kombination aus Polyacrylamid-Gelelektrophorese, in der die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches entsprechend der Proteingröße erfolgt (siehe Methodenteil 2.1.1, EMSA), und Immundetektion mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein. Die Immundetektion erfolgt in zwei Stufen: Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nylonmembran (Blotting) bindet ein spezifischer Primärantikörper an das Protein. Durch die Zugabe eines zweiten, enzymgekoppelten Antikörpers, wird das Protein in einer Chemilumineszenzreaktion visualisiert.

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden pro Ansatz 10 µg Proteinlysats mit 6 µl NuPage 4x LDS Sample Buffer, 2,4 µl NuPage Reducing Agent und H₂O auf ein Volumen von 24 µl verdünnt und für 10 min bei 70° C auf einem Heizblock denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im *Xcell SureLock Mini-Cell-System* der Firma Invitrogen auf einem NuPage Bis-Tris 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. Das Gel wurde in eine Vertikalapparatur eingesetzt, woraufhin die inneren und äußeren Kammern dieser Apparatur mit Laufpuffer befüllt wurden. Pro Geltasche wurden jeweils 20 µl des Reaktionsgemisches eingesetzt. Als Marker wurden 15 µl des *SeeBluePlus2 Prestained Standard* verwendet. Der Gellauf erfolgte 1 h bei 150 V.

Zur Vorbereitung des Blots wurde die Polyvinylidendifluorid (PVDF)–Membran in Methanol 100% 30 sec angefeuchtet. Darauf wurde diese 2 min in H₂O gewaschen und 15 min in Transferpuffer eingeweicht. Blotting-Pads und Filterpapier wurden vor Gebrauch ebenfalls kurz in Transferpuffer getränkt und wie folgt luftblasenfrei in die Blotting-Apparatur geklemmt: Kathode (-) - Blotting Pads-Filterpapier - Membran - Gel - Membran - Filterpapier - Blotting Pads - Anode (+). Die Blotting-Apparatur wurde mit

Transferpuffer und die äußere Kammer zur Kühlung mit Aqua ad injectabilia befüllt. Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte 1 h bei 30 V.

Die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurden kurz mit Waschpuffer gewaschen und 30 min in Blockierungs-Lösung unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, um so unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Materialien 1.7) erfolgte in 20 ml Blockierungs-Lösung über Nacht bei 4° C. Nach dem Verwerfen der Antikörperlösung wurde die Membran drei Mal für jeweils 10 min gewaschen und erneut in Blockierungs-Lösung für 30 min inkubiert. Die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in 20 ml Blockierungs-Lösung erfolgte 1 h bei Raumtemperatur. Nach dem Entfernen der Antikörper-Lösung wurde die Membran erneut dreimal 10 min gewaschen.

Zur Detektion der HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran mit 2 ml ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Reagent A und B im Verhältnis von 40:1) 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Exposition erfolgte an einem Entwicklungsgerät der Firma Kodak mit Hyperfilm ECL bei einer Belichtungsdauer zwischen 1 sec und 10 min.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von humanen Melanomzellen und Melanozyten

Die Zellkultur erfolgte im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂-Partialdruck in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Sämtliche Experimente mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Kultivierung humaner Melanomzellen sowie humaner Melanozyten erfolgte jeweils nach dem gleichen Prinzip. Lediglich das jeweils verwendete Kulturmedium (siehe Materialteil 1.6), das Waschmedium sowie das Medium zum Abstoppen nach dem Trypsinieren unterschieden sich.

Zum Splitten wurden die Melanomzellen zunächst mit HBSS/ PBS und die Melanozyten mit einem Medium aus HBSS, L-15 Leibovitz-Medium und DMEM gewaschen. Dann wurden sie mit einer 0,05%-igen Trypsin- oder 0,02%-igen EDTA-Lösung bei 37° C für 5 min abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins beziehungsweise der EDTA wurden die Zellen mit Medium mit 10-15% FKS versetzt. Das Aussetzen der Zellen in neue Zellkulturflaschen erfolgte mit frischem Medium in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:20. Für die Experimente wurde eine Konfluenz von 90% nicht überschritten.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in DMEM mit 15% FKS und 10% DMSO gebracht, das auf Eis gekühlt wurde. In diesem Medium wurden die Zellen zunächst in einem Styroporbehälter bei -80° C eingefroren. Nach 24 h erfolgte ihre Überführung in flüssigen Stickstoff.

Zellen, die wieder in Kultur genommen werden sollten, wurden bei 37° C 5 min aufgetaut. Da DMSO für die Zellen toxisch ist, wurden sie unmittelbar nach dem Auftauen in ihr entsprechendes Kulturmedium aufgenommen. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.4.3 Isolierung von Proteinen

Nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS oder HBSS, wurden die Zellen nach Zusatz von 4 ml PBS mit 0,02 % EDTA für 5 min bei 37° C inkubiert. Das EDTA wurde mit gleichem Volumen DMEM/ 10% FKS neutralisiert, woraufhin die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß gebracht wurde. Die Zellen wurden 5 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert, in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS und eine Zentrifugation über 3 min bei 4° C und 2.000 Upm. Nach Abnahme des Überstandes mit einer Pasteurpipette wurde das Zellpellet bei -80°C gelagert.

Mehrere Zellpellets wurden in einem Arbeitsgang in jeweils 200 µl frisch hergestelltem 1x CSH-Puffer resuspendiert und zur Lyse 20 min auf Eis gelagert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4° C und 13.000 Upm, welche eine Sedimentation der Cytoplasma- und Kernmembranen bewirkte. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bei -80° C eingefroren.

2.4.4 Isolierung von Zellkernproteinen

Für eine möglichst hohe Ausbeute der Kernproteinextraktion wurden die Zellen bis zu einer 90%-igen Konfluenz kultiviert. Die Extraktion der Kernextrakte erfolgte mit dem Nuclear Extract Kit von Active Motif. Dazu wurden die Zellen einmal in kalter, Phosphataseinhibitoren-haltiger PBS-Lösung gewaschen, mit einem Zellschaber nach Zugabe von 3 ml kalter PBS-Lösung abgelöst und 5 min bei 4° C und 500 Upm pelletiert. Zur Osmolyse der Zellen wurde das Pellet in 500 µl hypotonem Puffer (im Kit enthalten) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 25 µl Detergent und unter kräftigem Mischen für 10 sec kam es zum Aufschluss der Zytoplasmamembran. Durch Zentrifugation bei 4° C und 13.000 Upm über 30 sec wurden Zellkerne und Cytosolfraktion getrennt. Der Überstand mit cytoplasmatischem Protein wurde abgenommen und in einem Reaktionsgefäß bei -80° C eingefroren. Das

Kernpellet wurde in 50 µl des zuvor nach Anweisung des *Kits* hergestellten Complete-Lysepuffers aufgenommen und durch 10 min Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von DTT und eines Proteinaseinhibitors wurden die Zellkerne über 30 min auf einer sich bewegenden Plattform auf Eis lysiert. Die Zellkernmembranen wurden durch 30 sec Vortexen aufgebrochen und anschließend bei 4° C und 13.000 Upm über 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80° C eingefroren.

2.4.5 Transfektion von Oligonukleotiden

Transfektionen an Melanomzellen erfolgten mit doppelsträngigen Oligonukleotiden (dsODNs) und small-interfering-RNA (siRNA). Zur Transfektion von dsODNs wurde das Transfektionsreagenz Oligofectamine verwendet. Transfektionen von siRNA erfolgten mit Oligofectamine oder mit Lipofectamine RNAiMAX.

Beide Reagentien funktionieren nach dem Prinzip, dass kationische Lipide negativ geladene DNA binden und mit diesen Komplexe bilden. Die Aufnahme der Oligonukleotide über negativ geladene Strukturen auf der Zelloberfläche in die Zellen wird somit erleichtert.

2.4.5.1 Transfektion mit Oligofectamine

Am Tag vor der Transfektion wurden 100.000 Zellen in 3 cm-Schalen mit 2 ml Vollmedium ausgesetzt. Die Transfektion erfolgte bei 50% Konfluenz.

Zur Transfektion wurden entsprechende Mengen (siehe Transfektionsschemata unten) Oligofectamine mit dem OptiMEM-Medium versehen und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde die entsprechende Menge Oligonukleotid mit dem OptiMEM-Medium verdünnt. Anschließend wurde das Oligofectamine/ OptiMEM-Gemisch tropfenweise zur Oligonukleotid-Verdünnung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um der Liposomenbildung Zeit zu geben.

In der Zwischenzeit wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit 2 ml HBSS, in neue 3 cm-Schalen ausgesetzt und mit entsprechender Menge Vollmedium versetzt. Es folgte die tropfenweise Zugabe der DNA/ Liposomenmischung auf ein Endvolumen von 1 ml. Die Endkonzentration der Decoy-Oligonukleotide betrug 0,5 µM, 1 µM und 2 µM, die der siRNA 60 nM.

Es folgte die Inkubation der transfizierten Zellen bei 37° C. Für Matrigel Analysen wurden die Zellen nach 72 h retransfiziert und nach weiterer Inkubation über 72 h im Brutschrank für den Invasionsassay verwendet (Methodenteil 2.4.7).

Transfektionsschema für Decoy-Oligonukleotide:

- 8 µl **Oligofectamine** + 37 µl OptiMEM (V_E : 45µl) -> 10 min Inkubation bei RT
- 50 µl Decoy-ODNs [40 nM] + 205 µl OptiMEM (V_E : 255 µl)
- Oligofectamine/ OptiMEM zur Decoy-ODN-Verdünnung zugeben
- Zu den Zellen 700 µl Vollmedium geben, danach 300 µl Transfektionsreagenz hinzufügen (V_E : 1 ml).

Transfektionsschema für siRNA:

- 6 µl **Oligofectamine** + 24 µl OptiMEM (V_E : 30 µl) -> 10 min Inkubation bei RT
- 12 µl siRNA [20 µM] + 88 µl OptiMEM (V_E : 100 µl)
- Oligofectamine/ OptiMEM zur siRNA-Verdünnung zugeben
- Zu den Zellen 700 µl Vollmedium geben, danach 300 µl Transfektionsreagenz hinzufügen (V_E : 1 ml).

2.4.5.2 Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX

Für Transfektionen mit Lipofectamine RNAiMAX wurden 50.000 Zellen ein Tag vor der Transfektion in 3 cm-Schalen mit 2 ml Vollmedium ausgesetzt. Die Transfektion erfolgte bei etwa 40% Konfluenz.

Zur Transfektion wurden entsprechende Mengen siRNA mit dem OptiMEM-Medium verdünnt (Transfektionsschema siehe unten). Parallel dazu wurde in einem zweiten Reaktionsgefäß Lipofectamine RNAiMAX mit dem OptiMEM-Medium komplexiert. Die beiden Lösungen wurden vorsichtig gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml HBSS gewaschen und mit 1,25 ml Vollmedium überschichtet, worauf die siRNA/ Liposomenmischung hinzupipettiert wurde. Die siRNA-Endkonzentration betrug 30 nM bei einem Endvolumen von 1,5 ml. Die Inkubation erfolgte bei 37° C.

Transfektionsschema für siRNA mit Lipofectamine RNAiMAX:

- 1,25 µl **RNAiMAX** +125 µl OptiMEM (V_E : 126,25 µl)
- 1,5 µl siRNA [20µM] + 125 µl OptiMEM (V_E : 126,5 µl)
- RNAiMAX-Verdünnung zu siRNA-Verdünnung geben
- 15 min bei RT zur Komplexbildung inkubieren
- Zu den Zellen 1250 µl Vollmedium geben, danach 250 µl Transfektionsreagenz zugeben (V_E : 1,5 ml).

2.4.6 Immunfluoreszenzanalysen

Für Immunfluoreszenzanalysen wurde das sogenannte Chamber-Slide-System verwendet. Es handelt sich hierbei um Objektträger, welche an ihrer Oberfläche bereits mit einer Kammerstruktur versehen sind, so dass Zellkultivierung direkt auf dem Objektträger stattfinden kann.

Pro Kammer des Chamber-Slide-Systems wurden 50.000 Zellen ausgesetzt und in 1 ml Vollmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei etwa 70% Konfluenz analog zu dem unter 2.4.5.1 beschriebenen Prinzip der Transfektion mit Fluoreszenzeinisoithiocyanat (FITC)-markierten ODNs transfiziert. Nach 24 h Inkubation bei 37° C wurden Kammern und Kunststoffstege von dem darunter liegenden Objektträger entfernt. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen auf dem Objektträger zweimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Konservierung wurden einige Tropfen Antifade-Eindecklösung auf den Objektträger aufgetragen. Die Zellen wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt, welches mit Nagellack abgedichtet wurde. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm.

2.4.7 Matrigel Invasions-Assay

Die Fähigkeit eines Tumors, Metastasen zu bilden, setzt voraus, dass die Tumorzellen in der Lage sind, die Basalmembran zu infiltrieren und zu durchwachsen. Diesen Prozess bezeichnet man als Invasion. Der Matrigel Invasions Assay bietet die Möglichkeit, die Invasion verschiedener Tumorzellen in vitro zu untersuchen.

Es handelt sich bei dieser Methode um ein Zwei-Kammer Kultur-System, bei dem die Kammern durch eine poröse Membran, die mit einer künstlichen extrazellulären Matrix beschichtet ist, getrennt sind [Transwell Inserts (BD Biosciences), Durchmesser 6,4 mm, 8 µm Porengröße, PET-Membran]. Der Aufbau und das Prinzip des Matrigel Invasions-Assays ist in Abbildung 11 schematisch verdeutlicht.

Das Matrigel (BD, Bedford) stellt eine Rekonstruktion der Basalmembran dar. Diese künstliche Basalmembran wird aus dem Engelbrecht-Holm-Swarm- (EHS) Maustumor gewonnen und besteht im Wesentlichen aus den Proteinen Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfatproteoglykan (HSPG) und Entactin (Nidogen).

Das Funktionsprinzip des Assays beruht auf der chemotaktischen Migration der Tumorzellen durch das Matrigel, welche durch einen Serum-Konzentrationsgradienten (obere Kammer serumfrei, untere Kammer serumhaltig) ausgelöst wird. Die Auswertung erfolgt durch Auszählen der durch das Matrigel an die Unterseite der Membran migrierten Zellen unter dem Lichtmikroskop.

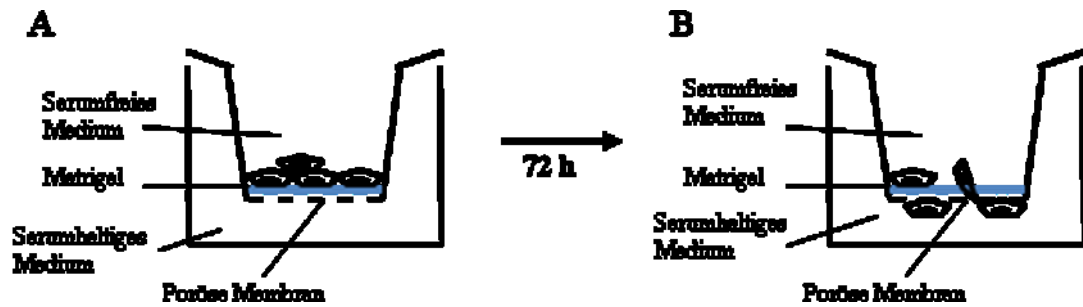


Abb. 11: Schematische Darstellung des Matrigel Invasionsassays

A: Zu Beginn des Experiments werden 50.000 Zellen in die obere Kammer auf die mit Matrigel beschichtete poröse Membran ausgesetzt. Während das Medium in der oberen Kammer serumfrei ist, enthält das Medium der äußeren Kammer 2% FKS, welches als Chemoattraktans fungiert. B: Nach einer Inkubation von 72 h wandern die invasiven Zellen durch die Matrigel-Schicht auf die Unterseite der Membran. Beide Kammern enthalten ein Transfektionsgemisch mit siRNA.

Ein 50 µl-Aliquot des Matrigels wurde mit kaltem PBS im Verhältnis von 1:13 verdünnt und möglichst rasch sowie luftblasenfrei auf den Filter der Inserts pipettiert. Nach Einsetzen der Inserts in eine 24-Well-Platte folgte eine Inkubation bei 37° C für 3 h. Das gelierte Gel wurde anschließend unter der Sterilbank bei leicht geöffnetem Plattendeckel über Nacht getrocknet. Am folgenden Tag wurde das Gel mit 200 µl serumfreien Medium 2 h unter der Sterilbank rehydriert. 1,5 h vor Ende der Rehydrierung wurden die Zellen, welche zuvor in Kultur zweimal mit siRNA transfiziert wurden (Methodenteil 1.4.5.1), mit 1 ml HBSS oder PBS gewaschen, mit 500 µl PBS/EDTA abgelöst und 3 min bei 4° C und 2.000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml serumfreien Medium resuspendiert und zweimal über 3 min bei 4° C und 2.000 Upm gewaschen. Nach Auszählung in der Neubauer-Zählkammer wurden 50.000 Zellen in 250 µl serumfreien Medium in die obere Kammer gegeben. Die äußere Kammer wurde mit 609 µl serumhaltigem Vollmedium befüllt. Die innere Kammer wurde hingegen mit serumfreiem Medium auf ein Endvolumen von 300 µl gefüllt, so dass das Volumen der inneren und der äußeren Kammer insgesamt dem in einer 3 cm-Schale und damit den Bedingungen der anderen Transfektionsversuche entsprach. Parallel wurde der Transfektionsansatz vorbereitet (Methodenteil 1.4.5.1). Das Transfektionsgemisch mit einer siRNA-Konzentration von 60 nM und einem Endvolumen von 130 µl, wurde entsprechend dem Volumenverhältnis der Medien in den Kammern auf die innere (39 µl) und die äußere Kammer (91 µl) verteilt. Es folgte eine Inkubation der Ansätze über 72 h im Brutschrank. Die Experimente wurden abgestoppt, indem die Inserts aus den Wells herausgenommen wurden und das

Matrigel mit der gedrehten Spitze eines Zellstofftuches vorsichtig mehrmals ausgewischt wurde.

Damit wurden die Zellen insgesamt dreimal transfiziert (zweimal in Kultur, einmal im Matrigel). Der zeitliche Abstand zwischen den Transfektionen betrug jeweils 72 h.

Nach dem Abstoppen des Experiments wurden die Inserts einer Färbereihe zugeführt, die mit dem Diff-Quick-Färbeset durchgeführt wurde. Die Prozedur bestand aus dem Eintauchen der Inserts zunächst in eine Fixierlösung, danach in zwei unterschiedliche Färbelösungen (Eosin, Thiazin) und abschließend in zwei mit destilliertem Wasser gefüllten Behälter. Die Inkubationszeit der einzelnen Inserts betrug jeweils zehnmal 1 sec, wobei zwischendurch die überschüssige Flüssigkeit immer wieder seitlich mit Papier abgesaugt wurde. Nach Abschluss der Färbereihe wurden die Inserts an der Luft getrocknet.

Die quantitative Auswertung erfolgte mikroskopisch. Aus der Anzahl der Zellen von drei Gesichtsfeldern wurde von je drei Inserts der Mittelwert gebildet.

2.5 Statistische Analysen

Die statistische Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität von p65 wurde durch einen t-Test unter Verwendung der SPSS Software PASW statistics 17 durchgeführt. Als signifikant () gelten Werte $p < 0,05$. Als nicht signifikant (n.s.) gelten Werte $p > 0,05$.

ZIELSETZUNG

Der Transkriptionsfaktor NFκB reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen. Aktiviertes NFκB führt zu einer vermehrten Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und hat damit eine wichtige Funktion im Rahmen der Immunantwort. Darüber hinaus ist NFκB auch in einer Reihe von Tumoren einschließlich des malignen Melanoms vermehrt aktiviert.¹⁸⁵ Vergleichende Studien an anderen Tumoren haben gezeigt, dass NFκB an der Regulation der Apoptose, der Angiogenese sowie der Invasion beteiligt ist und damit die Tumorentstehung und -progression beeinflusst. Beim Melanom ist die funktionelle Bedeutung der erhöhten NFκB-Aktivität bislang nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivierung von NFκB in Melanomzelllinien aus Tumoren verschiedener Progressionsstadien zu charakterisieren. Anschließend sollte in funktionellen Analysen die biologische Rolle von NFκB im malignen Melanom ermittelt werden.

ERGEBNISSE

1 Charakterisierung der NFκB-Aktivierung

1.1 Analyse der NFκB-Aktivierung über EMSA

Die Aktivierung von NFκB in Melanomzellen wurde zunächst über den Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) analysiert. Dazu wurden Nuklearextrakte von humanen Melanomzellen unterschiedlicher Progressionsstadien sowie von humanen Melanozyten mit einer Sonde, welche eine Konsensussequenz für NFκB enthielt, (Methodenteil 2.1.1), inkubiert und anschließend elektrophoretisch im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (siehe Abbildung 12).

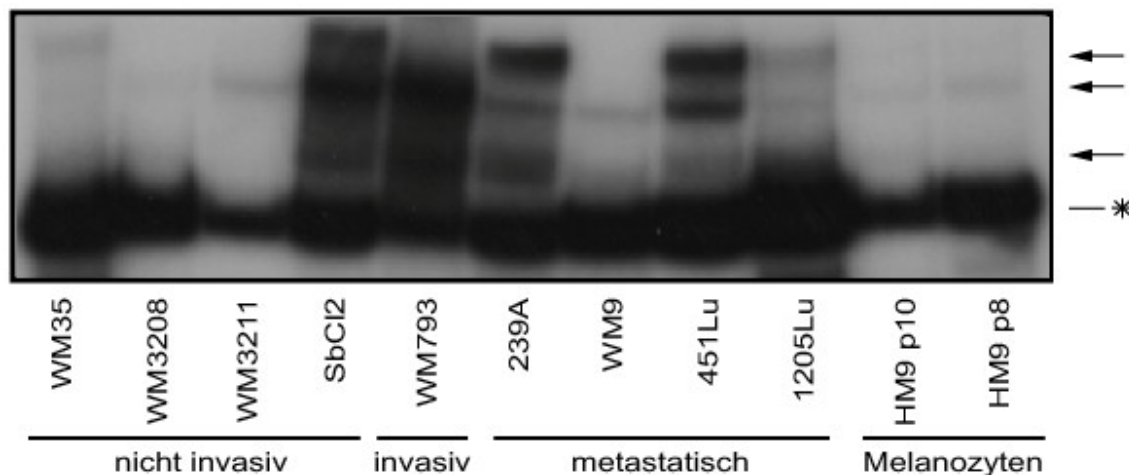


Abb. 12: Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA mit Nuklearextrakten aus Melanomzellen nicht-invasiver, invasiver und metastatischer Progressionsstadien und aus humanen Melanozyten (HM9). Die gebildeten DNA-Protein-Komplexe zwischen aktiviertem NFκB-Dimer und der DNA-Sonde zeigten im Polyacrylamid-Gel ein retardiertes Wanderungsverhalten. Nuklearextrakt der Melanozytenzellen HM9 stammte aus zwei aufeinanderfolgenden Passagen während der Zellkultivierung (p10, p8). 15 µg Nuklearextrakt wurde jeweils mit ^{32}P -markiertem doppelsträngigen Oligonukleotid inkubiert, welches die NFκB-Konsensussequenz enthielt. Spezifische Bindungskomplexe sind mit einem Pfeil markiert, während der Stern die unspezifischen Bindungskomplexe kennzeichnet.

Spezifisch an die Konsensussequenz der Sonde gebundenes NFκB wurde als DNA-Protein-Komplex im Polyacrylamid-Gel retardiert. Die EMSA-Untersuchungen ergaben eine deutliche Zunahme der NFκB-Bindungsaktivität in invasiven und metastatischen Melanomzelllinien gegenüber normalen humanen Melanozyten. Die Bindungsaktivität von NFκB in den untersuchten nicht-invasiven Zelllinien war dabei vergleichbar mit der in normalen Melanozyten. Eine Ausnahme stellte die SbCl-2-Zelllinie dar, deren

Signalintensität eine genauso starke Ausprägung aufwies, wie diejenige der invasiven oder metastatischen Zelllinien.

Bei den sechs von neun Melanomzelllinien, die eine vermehrte Bindungsaktivität des NFκB zeigten, konnten zwei, bei einigen Zelllinien auch drei spezifische Banden beobachtet werden. Die Bildung der Protein/ DNA-Komplexe konnte spezifisch gehemmt werden. Dies erfolgte durch ein im 300-fachen Überschuss zugegebenes, nicht markiertes Oligonukleotid mit Konsensussequenz (Kompetitor; siehe Abbildung 13, Spalten 1). Die Zugabe eines Oligonukleotids mit einer für das NFκB irrelevanten Sequenz, führte im Gegensatz dazu nur zu einer unvollständigen kompetitiven Aufhebung der zwei beziehungsweise drei langsamer migrierenden Banden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die am schnellsten migrierende Bande blieb hingegen weiterhin erhalten und wurde so als unspezifisch identifiziert.

Die genauere Charakterisierung der an die DNA-Sonde gebundenen NFκB-Untereinheiten wurde in Supershift-Analysen (siehe unten) durchgeführt.

1.2 Identifikation der NFκB-Untereinheiten

Um aktives NFκB genauer zu charakterisieren, wurden Supershift-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden die Nuklearextrakte vor Zugabe der Sonde, jeweils mit Antikörpern gegen die Untereinheit p50 und p65 inkubiert (Methodenteil 2.1.1.4). Bei Vorhandensein der entsprechenden Transkriptionsfaktor-Untereinheit, würde es durch Bindung des Antikörpers an den DNA/ Protein-Komplex zu einer zusätzlichen Retardierung des nun ein größeres Molekulargewicht aufweisenden Komplexes im Gel kommen. Interagiert der Antikörper an der spezifischen Bindestelle zwischen Sonde und Transkriptionsfaktor-Untereinheit, so könnte dies auch eine Abschwächung des DNA/ Protein-Komplexes und damit ein Verschwinden der entsprechenden Bande zur Folge haben.

Abbildung 13 zeigt Supershift-Analysen der Zelllinien WM793 und WM9.

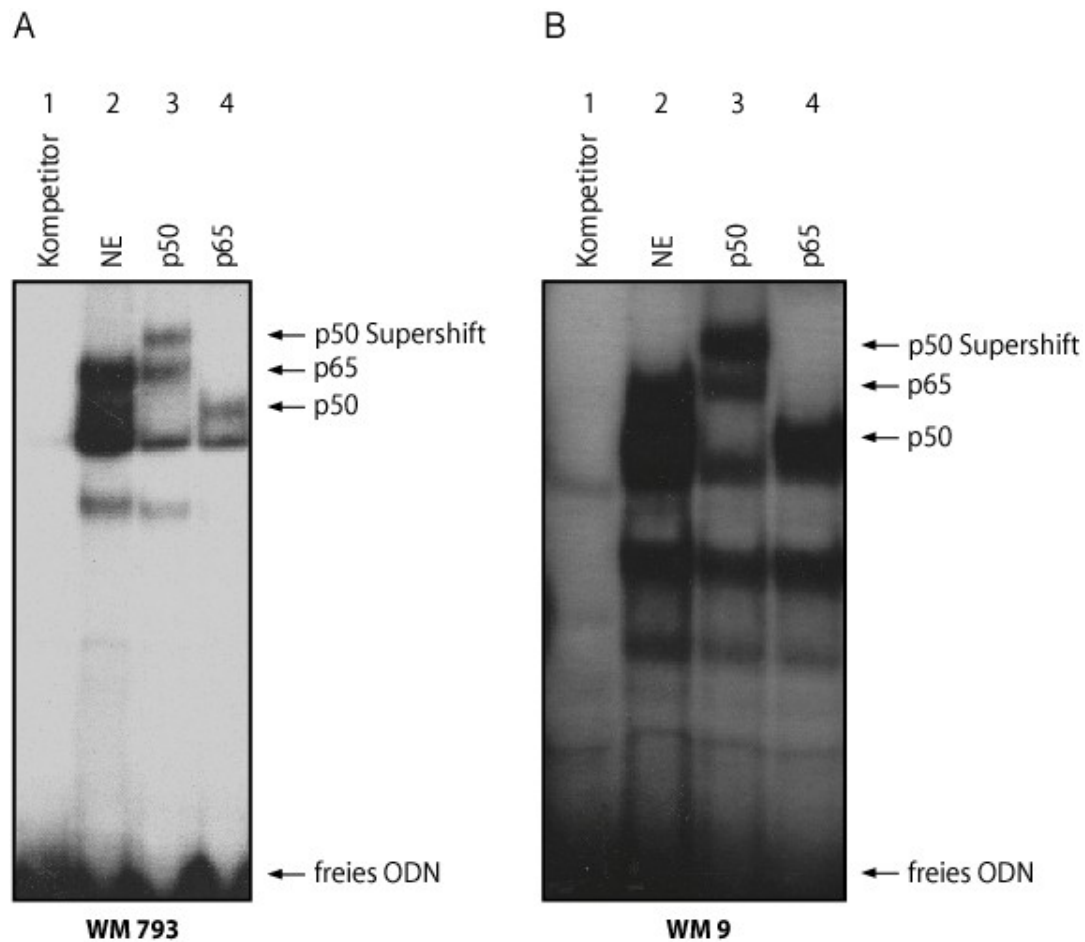


Abb. 13: Supershift und Kompetitionsanalysen mit Nuklearextrakten aus den Melanomzelllinien WM793 (invasiv) und WM9 (metastatisch)

Abkürzungen: ODN: Oligonukleotid; NE: Nuklearextrakt. 15 µg Nuklearextrakt wurde jeweils mit einem ^{32}P -markierten, doppelsträngigen Oligonukleotid inkubiert, das die Konsensussequenz für NFκB enthielt. Spezifische Bindungskomplexe sind mit einem Pfeil markiert. Spalte 2 zeigt einen Reaktionsansatz, bei welchem Nuklearextrakt der Zelllinie WM793 (links) bzw. WM9 (rechts) mit einem ^{32}P -markierten NFκB-Oligonukleotid inkubiert wurde. Die Zugabe eines nicht markierten, ansonsten identischen Oligonukleotides zum Reaktionsansatz in 300-fachem Überschuss (Spalte 1) als Kompetitor führte zu einer Aufhebung der spezifischen Banden. Für Supershift-Analysen wurden die Nuklearextrakte vor Zugabe der Sonde mit Antikörpern gegen p50 (Spalten 3) bzw. gegen p65 (Spalten 4) inkubiert.

Präinkubation der Nuklearextrakte mit dem Antikörper gegen die p50-Untereinheit resultierte in einem Supershift der unteren, spezifischen Bande in beiden Ansätzen (Abbildung 13).

Präinkubation mit dem Antikörper gegen p65 hingegen führte bei beiden Reaktionsansätzen zur Aufhebung der oberen (Abbildung 13) beziehungsweise mittleren spezifischen Bande (Ergebnisse nicht dargestellt). Darüber hinaus ließ sich bei Verwendung von anti-p65- beziehungsweise anti-p50-Antikörpern eine leichte Abschwächung der p50 beziehungsweise der p65 Bande feststellen.

1.3 Analyse der NFκB-Aktivierung über ELISA

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die transaktivierende Aktivität von NFκB von der Zusammensetzung des Dimers abhängt. Während das Homodimer p50/p50 auf die Genexpression inhibitorisch wirken kann, hat das Heterodimer p65/p50 auf seine Zielgene eine aktivierende Wirkung.¹⁸⁶

Weitere Untersuchungen bezüglich dieser beiden Untereinheiten von NFκB erfolgten über ELISA. Als Erstes wurde die DNA-Bindungsaktivität von p50 untersucht (Abbildung 14). Das dabei verwendete Gesamtzellprotein wurde zunächst mit den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten, doppelsträngigen, die NFκB-Konsensussequenz enthaltenden Oligonukleotiden inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Antikörpern gegen p50.

In Abbildung 14 sind die relativen Werte der p50-Untereinheit aus verschiedenen Melanomzelllinien versus Melanozyten dargestellt.

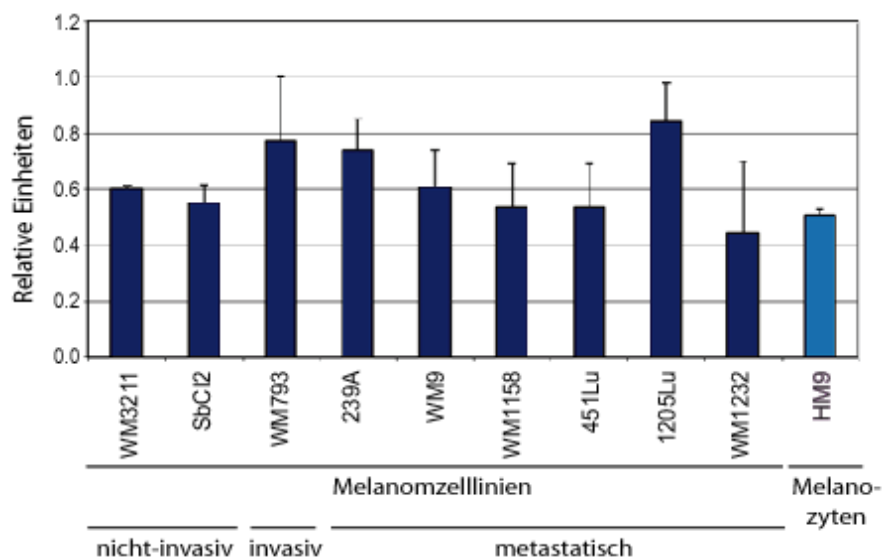


Abb. 14: DNA-Bindungsaktivität von p50 in Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstadien versus Melanozyten

ELISA-Analysen wurden mit 10 µg Gesamtzellprotein pro Ansatz durchgeführt. Nach Bildung von DNA-Protein-Komplexen mit den immobilisierten doppelsträngigen Oligonukleotiden erfolgte die Inkubation mit einem Antikörper gegen die p50-Untereinheit. Dieser wurde mit Hilfe eines zweiten Antikörpers in einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle wurde ein vom Hersteller mitgelieferter Kernproteinextrakt der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji verwendet. Die optische Dichte der einzelnen Messungen wurde mit der optischen Dichte des Raji-Nuklearextraktes normalisiert, um Unterschiede der verschiedenen Experimente auszugleichen. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit Standardabweichungen.

Es zeigte sich bei diesen Analysen, dass hinsichtlich der DNA-Bindungsfähigkeit von p50 kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Melanomzelllinien gegenüber Melanozyten besteht.

Analog dazu wurde die DNA-Bindungsaktivität von p65 untersucht (Abbildung 15).

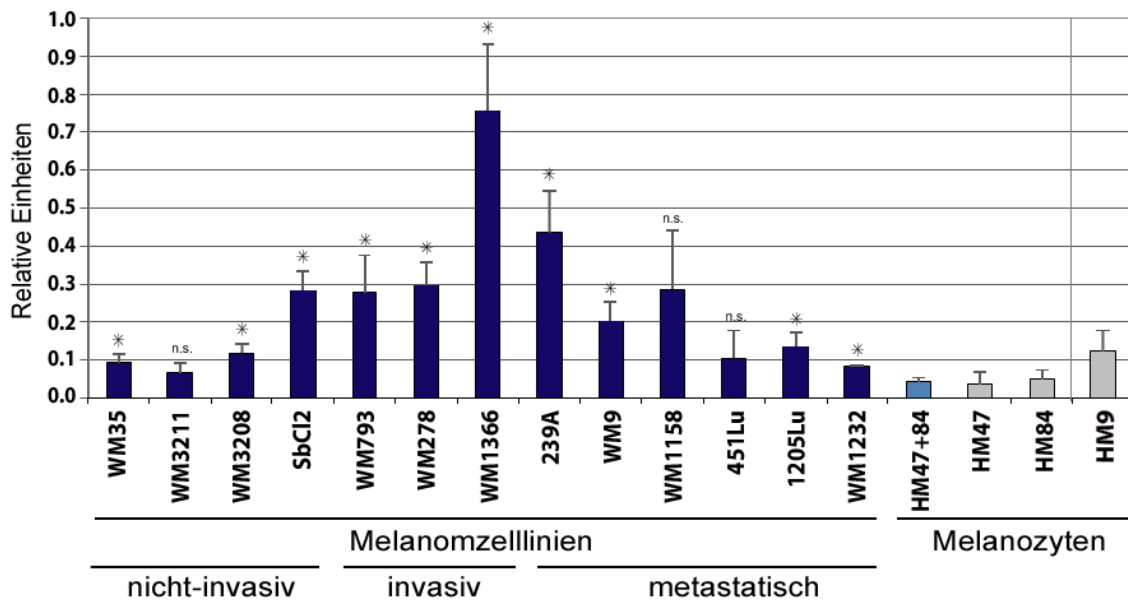


Abb. 15: DNA-Bindungsaktivität von p65 in Melanomzellen unterschiedlicher Progressionsstadien versus Melanozyten

ELISA-Analysen von p65 erfolgten analog zu den Analysen der p50-Untereinheit. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede der DNA-Bindungsaktivität von p65 ($p < 0,05$) zu den Melanozyten HM47 und HM84 sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Als nicht signifikant (n.s.) gelten Werte $p > 0,05$.

Von den 13 untersuchten Melanomzelllinien zeigte sich bei 10 Melanomzelllinien eine signifikante Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität von p65 (mit Sternchen gekennzeichnet) gegenüber der p65-Bindungsaktivität der Melanozyten HM47 und HM84. Diese war in den Zelllinien invasiver Progressionsstadien am deutlichsten ausgeprägt. Die p65-Bindungsaktivität bei HM9 war im Vergleich zu HM47 und HM84 auffällig hoch. Im EMSA war diese jedoch nicht feststellbar. Daher wurde HM9 nicht als Referenz zur Signifikanzberechnung verwendet.

Insgesamt konnte mit den EMSA-Untersuchungen gezeigt werden, dass die p65-Untereinheit von NF κ B in 10 von 13 untersuchten Melanomzelllinien eine signifikant erhöhte DNA-Bindungsaktivität von p65 gegenüber den Melanozytenzelllinien HM47 und HM84 aufwies. Die DNA-Bindungsaktivität von p65 war in den invasiven Zelllinien am stärksten ausgeprägt (Abbildung 15). Eine deutliche Dysregulation von p50 konnte

in Melanomzellen gegenüber Melanozyten hingegen nicht festgestellt werden (Abbildung 14).

2 Inhibition von NFκB für funktionelle Analysen

Um die biologische Bedeutung von NFκB im malignen Melanom zu untersuchen, sollte NFκB gehemmt werden. Zwei Verfahren kamen hierbei zur Anwendung.

Zum einen wurden doppelsträngige Oligonukleotide eingesetzt, die eine Konsensussequenz für NFκB aufweisen und auch als Cis-Element-Decoys oder NFκB-Decoy-Oligonukleotide bezeichnet werden. Durch Bindung an den Transkriptionsfaktor können sie seine transaktivierende Aktivität an der DNA kompetitiv inhibieren, was bereits in mehreren Studien als ein wirkungsvolles Verfahren zur Inhibition der NFκB-Aktivität beschrieben wurde.^{187 188}

Zum anderen wurde NFκB über den Mechanismus der RNA-Interferenz gehemmt. Über sogenannte *small interfering RNA (siRNA)* erfolgt eine sequenzspezifische Geninhibition von p65 (zur Übersicht ¹⁸⁹).

Die nachfolgenden Inhibitionsstudien und funktionellen Analysen wurden an den Melanomzelllinien 1205Lu und WM239A durchgeführt. Mit der Zelllinie 1205Lu bestand im Labor die bislang größte Erfahrung und sie war auch durch andere Arbeitsgruppen bereits sehr gut charakterisiert. Die Transfektionen von DNA-Oligonukleotiden und siRNA-Oligonukleotiden waren bei dieser Zelllinie bereits gut etabliert. Ferner gab es Vorstudien bezüglich der Eignung dieser Zelllinie für Invasionsassays.

Bei den Melanozytenlinien HM47 und HM84 lag die DNA-Bindungsaktivität der p65-Untereinheit von NFκB bei 0,036 relativen Einheiten (HM47) und 0,051 relativen Einheiten (HM84), nur bei HM9 war diese hoch (0,124 rel. Einheiten). Im Vergleich zu den Melanozyten (HM9; HM47, HM84; Mittelwert: 0,070 rel. Einheiten) war die p65-Aktivierung bei 1205Lu (0,137 rel. Einheiten) fast doppelt so hoch. Auch in den EMSA-Untersuchungen zeigte sich eine erhöhte Aktivität von NFκB in 1205Lu im Vergleich zu den Melanozyten (HM9; Abb. 12), die im ELISA eine hohe Aktivierung aufwiesen. Somit erschien die Verwendung dieser Zelllinie für weitere Analysen gerechtfertigt.

Darüber hinaus wurde für die folgenden Experimente die Zelllinie WM239A ausgewählt, weil sie eine besonders hohe NFκB-Aktivierung im ELISA zeigte (0,437 rel. Einheiten, Abb. 15).

2.1 Etablierung der Transfektionsbedingungen für Decoy-Oligonukleotide

Zunächst wurden Bedingungen für eine effektive Transfektion der doppelsträngigen NFκB-Decoy-Oligonukleotide (Decoy-ODNs) in Melanomzellen etabliert.

Dazu wurden Zellen der Linie 1205Lu zunächst mit Decoy-Oligonukleotiden transfiziert, die an ihrem 5'-Ende mit dem Fluorochrom FITC markiert waren und darüber hinaus ein Phosphorothioat-modifiziertes Rückgrat (Methodenteil 2.4.6) aufwiesen. Anschließend wurde ihre Aufnahme in die Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht (siehe Abbildung 16).

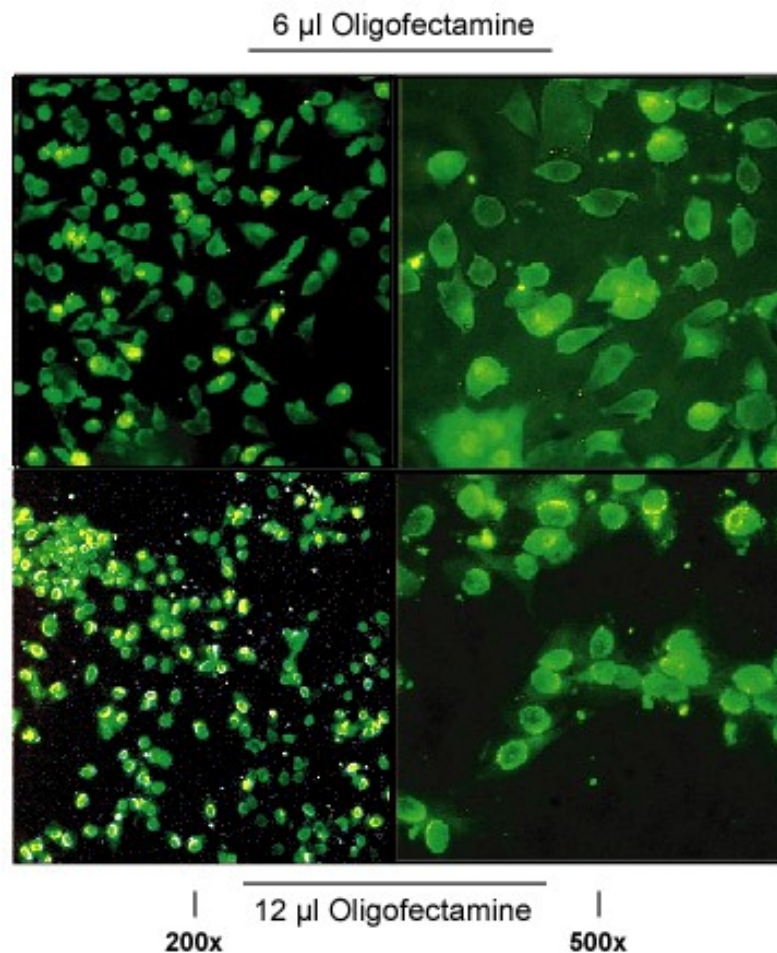


Abb. 16: Aufnahme von Decoy-Oligonukleotiden in 1205Lu Melanomzellen in der Fluoreszenzmikroskopie (200- und 500- fache Vergrößerung)

Transfektionen von 1205Lu Zellen erfolgten mit Decoy-Oligonukleotiden in einer Konzentration von 1 µM. Als Transfektionsmittel wurde Oligofectamine verwendet. Nach 24 h wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Transfektionen, die mit 12 µl Oligofectamine durchgeführt wurden (untere Bildreihe), zeigen eine höhere intrazelluläre Aufnahme der Decoy-Oligonukleotide als Transfektionen mit 6 µl Oligofectamine (obere Bildreihe). Die Aufnahmen rechts zeigen den jeweiligen Ansatz in einer höheren Vergrößerung, um die Lokalisation der aufgenommenen Decoy-Oligonukleotide innerhalb der Zellen zu veranschaulichen.

In Abbildung 16 dargestellt sind 1205 Lu Melanomzellen, die eine zelluläre und nukleäre Anreicherung des Fluorochroms FITC zeigen. Die nukleäre Aufnahme und

Anreicherung der Oligonukleotide nimmt bei gleicher Menge Oligonukleotid (1 μM) und der doppelten Menge an Oligofectamine (12 μl) weiter zu, bis schließlich bei Mengen von 24 μl zytotoxische Effekte auftraten (nicht dargestellt).

Die Tatsache, dass Oligonukleotide in den Zellkern gelangen, ist Voraussetzung für einen Effekt an dem aktiven, in den Zellkern translokalisierten Transkriptionsfaktor NF κ B.

2.2 Stabilitätsuntersuchungen der Decoy-Oligonukleotide

Stabilitätsuntersuchungen der Decoy-ODNs in Zellen (Methodenteil 2.2.1) 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion erfolgten über die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE, siehe Abbildung 17).

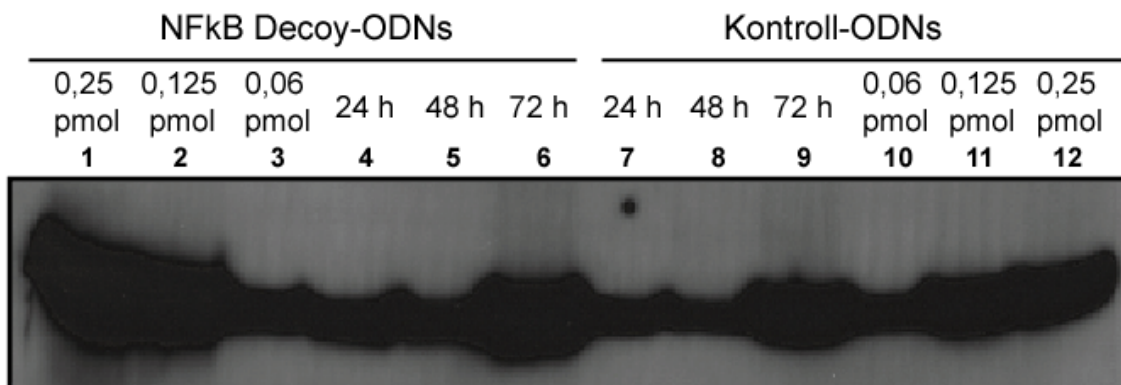


Abb. 17: Stabilitätsanalyse der in die Zellen aufgenommenen dsDecoy-ODNs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion

In den Reihen 1-3 und 10-12 wurden Oligonukleotide mit NF κ B-Konsensussequenz oder Kontroll-Oligonukleotide in Mengen von 0,25, 0,125 und 0,06 pmol aufgetragen. Reihen 4-9 zeigen DNA-Extraktionen 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit dsDecoy-ODNs (Reihen 4-6) und mit Kontroll-ODNs (Reihen 7-9) in 1205Lu. Die Konzentration der transfizierten ODNs betrug 1 μM . Alle ODNs waren am 3'-Ende mit DIG markiert. Als Transfektionsmittel wurde Oligofectamine verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der doppelsträngigen DNA erfolgte in einem 16%-igen Polyacrylamidgel.

24 h nach Transfektion der Zellen mit dsDecoy-ODNs oder Kontroll-ODNs stellten sich die ODNs bei der Auftrennung im Gel als Bande dar, deren Breite 0,06 pmol an pur eingesetztem Decoy-ODN entspricht. Diese Bande zeigte sich 48 h nach Transfektion unverändert. 72 h nach Transfektion nahm die Intensität der Bande um das Doppelte zu, was mit einer Menge von 0,125 pmol an aufgetragenen Decoy-ODNs vergleichbar ist. Die Zunahme des Oligonukleotids lässt sich dadurch erklären, dass bei der Durchführung dieser Experimente die absolute DNA-Menge der kultivierten Zellen nach 3 d analysiert wurde, ohne dass zuvor eine Normalisierung bezüglich der Zellzahl

durchgeführt wurde. Dies erschien gerechtfertigt, da die Untersuchung der Oligonukleotid-Stabilität anhand des Auftretens von Degradationsprodukten erfolgte. Die Zellzahl war dementsprechend nach 3 d deutlich höher als nach 24 h oder 48 h. Die Zunahme der DNA am 3. Tag kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass durch die in der Zwischenzeit stattgefundenene Vermehrung der Zellen und die fehlenden zwischenzeitlichen Waschschriffe mehr Zellen transfiziert wurden und damit mehr Oligonukleotide im untersuchten Zelllysats vorlag.

Das Auftreten von degradierten Oligonukleotiden in Form von schneller migrierenden Banden wurde nicht beobachtet. Insgesamt schien die Stabilität der Decoy-ODNs ausreichend.

2.3 Effektivität der Inhibition von NFκB mit Decoy-Oligonukleotiden

Nachdem eine erfolgreiche Aufnahme sowie eine ausreichend lange Stabilität der Decoy-Oligonukleotide in den transfizierten Zellen gezeigt werden konnten, wurde ihre Wirkung auf NFκB analysiert.

Dazu wurde die Expression von IL-8, das bekanntermaßen von NFκB reguliert wird¹⁹⁰, über Echtzeit-PCR untersucht (siehe Abbildung 18).

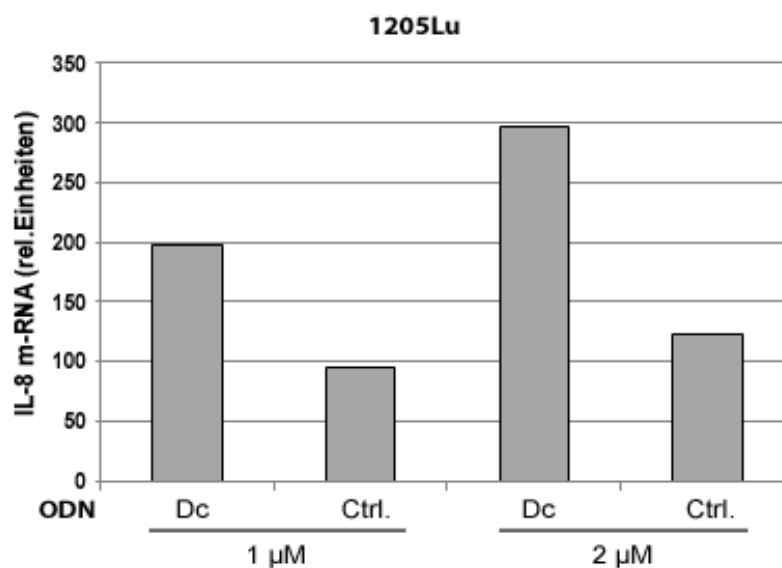


Abb. 18: Wirkung von NFκB-Decoy-Oligonukleotiden auf die Expression des NFκB-Zielgens IL-8 in Melanomzellen

Transfektionen mit Digoxigenin (DIG)-markierten Decoy- bzw. Kontroll-Oligonukleotiden erfolgten an Zellen der metastatischen Melanomzelllinie 1205Lu in einer Konzentration von 1 und 2 μM. 72 h nach Transfektion mit Decoy- bzw. Kontroll-Oligonukleotiden wurde die RNA präpariert und über Echtzeit-PCR analysiert. Die dargestellte Menge an IL-8 mRNA wurde mit der Anzahl der Transkripte des nicht regulierten *Housekeeping*-Gens HPRT normalisiert.

Echtzeit-PCR-Analysen zeigten bei DIG-markierten NFκB-Decoy-ODNs im Vergleich zu Kontroll-ODNs keine Reduktion der IL-8 mRNA. Auch die Steigerung der Oligonukleotid Konzentration auf 2 μM resultierte in keiner Hemmung gegenüber Kontrollen.

Daraufhin wurden phosphorothioat-modifizierte Decoy-ODNs zur Hemmung von NFκB analysiert, die auch in anderen Studien zur NFκB-Inhibition geführt haben.¹⁹¹ Sie wurden in den Zelllinien 1205Lu und WM239A untersucht, wobei die Analyse über die Expression von IL-8 erfolgte (siehe Abbildung 19).

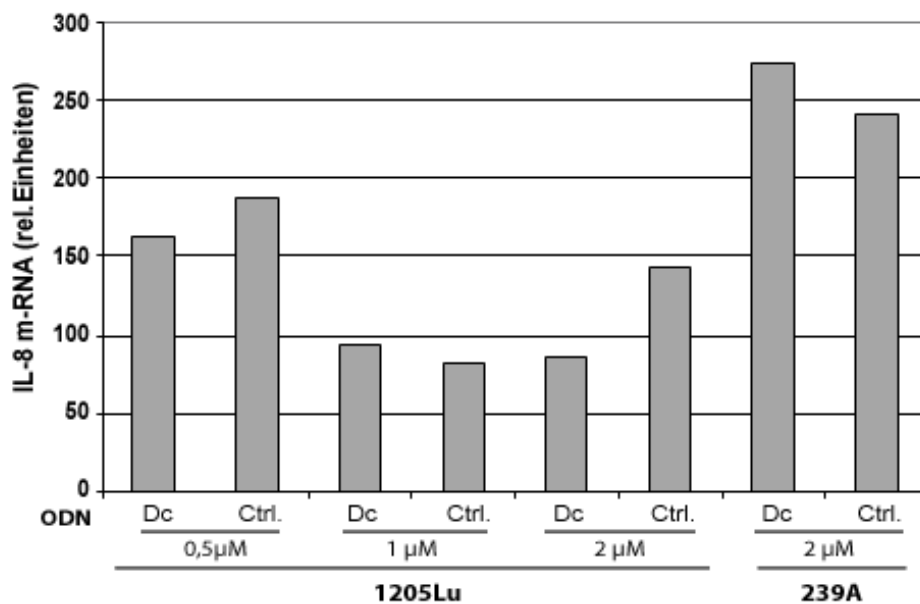


Abb. 19: Wirkung Phosphorothioat (PTO) -modifizierter Decoy-Oligonukleotide auf IL-8-Expression in Melanomzellen

Transfektionen mit PTO-Decoy- bzw. Kontroll-Oligonukleotiden erfolgten an den metastatischen Melanomzelllinien 1205Lu und WM239A in Konzentrationen von 0,5, 1 und 2 μM. Präparation der RNA und Echtzeit-PCR-Analysen erfolgten 72 h nach der Transfektion. Die dargestellte Menge an IL-8 mRNA wurde mit der Anzahl der Transkripte des nicht regulierten *Housekeeping*-Gens HPRT normalisiert.

Die Wirkung der PTO-modifizierten Decoy-ODNs auf die IL-8-Expression zeigte in der Zelllinie WM239A im Vergleich zu Kontroll-Oligonukleotiden keine Hemmung. In der Zelllinie 1205Lu wurde nur bei Konzentrationen der Decoy-ODNs von 2 μM eine geringgradige Hemmung der IL-8-Expression beobachtet.

Damit konnte mit Decoy-ODNs trotz effizienter Transfektion und ausreichender Stabilität der Oligonukleotide keine signifikante Hemmung von NFκB nachgewiesen werden.

2.4 Inhibition von NFκB über RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz ist ein Mechanismus, der eine posttranskriptionelle Inhibition der Genexpression induziert. Er kann durch 19-23 Nukleotide lange, doppelsträngige siRNAs getriggert werden, was zu einer Inhibition von Genen mit homologer Sequenz führt. Die Einschleusung synthetisch hergestellter siRNAs (*small interfering RNA*) in kultivierte Zellen kann dabei mit Hilfe liposomaler Transfektion erfolgen.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigt die p65-Untereinheit von NFκB in Melanomzellen unterschiedlicher Progressionsstadien, insbesondere in der invasiven Phase, eine starke Aktivierung im Vergleich zu Melanozyten.

Die in dieser Arbeit eingesetzte siRNA wurde daher so gestaltet, dass sie zur Hemmung von p65 führt.

Als Kontrolle wurde eine siRNA verwendet, deren Sequenz keine Homologien zum menschlichen Genom aufwies (CO4).

2.4.1 Hemmung der p65-Untereinheit mittels siRNA auf mRNA-Ebene

Zunächst wurde untersucht, inwieweit p65-spezifische siRNA die Expression des p65-Proteins beeinflusst.

48 h nach Transfektion der Zellen mit p65 siRNA oder Kontroll-siRNA erfolgte die RNA-Extraktion. Nach der reversen Transkription der isolierten RNA, folgte die Analyse über Echtzeit-PCR (Abbildung 20).

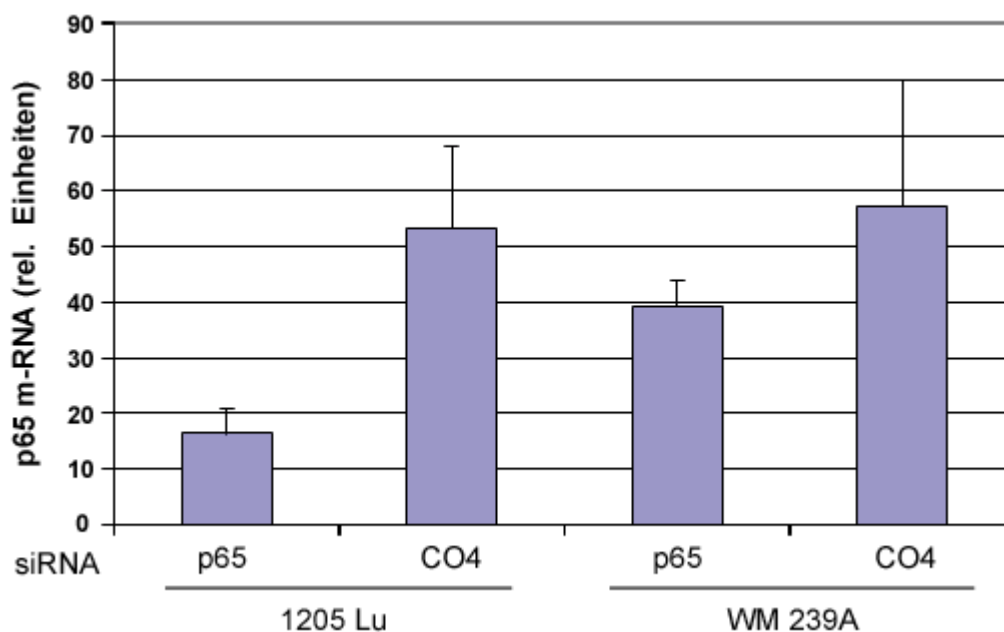


Abb. 20: p65 mRNA-Expression 48 h nach Transfektion mit p65 siRNA

Quantitative RT-PCR-Analyse der p65-Untereinheit in den metastatischen Melanomzelllinien 1205Lu und WM239A. Als Transfektionsreagenz wurde Oligofectamine verwendet. Die Zellen

wurden entweder mit p65 siRNA (p65) oder mit Kontroll-siRNA (CO4) transfiziert. Die Konzentration der siRNA betrug 60 nM. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

P65 mRNA war in Ansätzen der mit p65 siRNA behandelten Zelllinie 1205Lu 48 h nach Transfektion im Vergleich zu den Kontrollen um 69% reduziert. Dieser Unterschied betrug bei WM239A-Zellen etwa 32%.

In weiteren Versuchen wurde 72 h nach der ersten Transfektion erneut transfiziert und 72 h später erneut die p65-Expression gemessen (Abbildung 21).

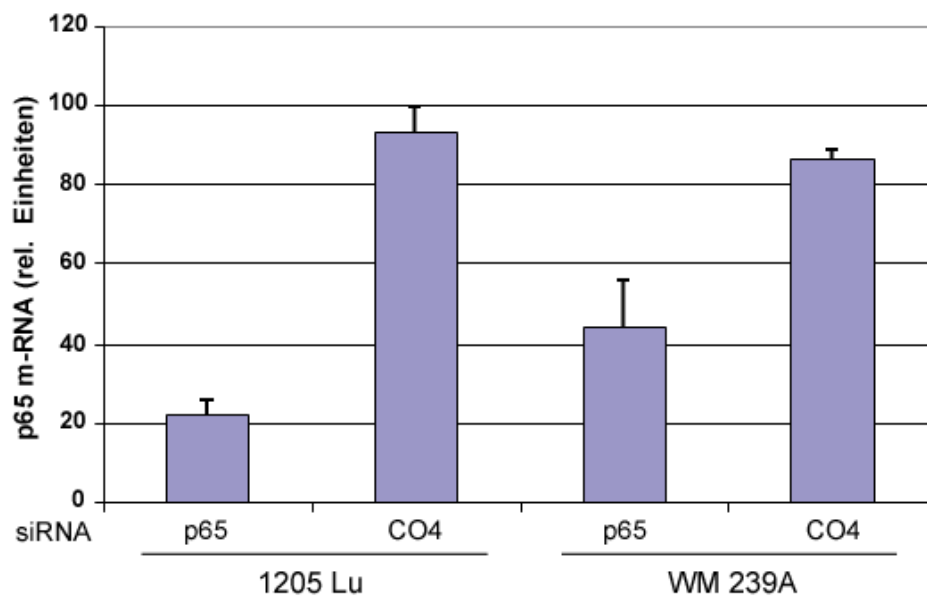


Abb. 21: p65 mRNA-Expression 6 Tage nach zweimaliger Transfektion mit p65 siRNA

Quantitative RT-PCR-Analysen in den Melanomzelllinien 1205Lu und WM239A. 72 h nach der ersten Transfektion wurden die Zellen retransfiziert und 72 h danach die RNA analysiert. P65 siRNA-transfizierte Zellen (p65) wurden mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (CO4) verglichen. Die Transfektionen erfolgten in einer Konzentration von 60 nM. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Nach 6 Tagen war die p65 mRNA in der Zelllinie 1205Lu um 76% und in WM239A-Zellen um 48% gegenüber den Kontrollen reduziert. Die Effizienz der siRNA nahm also nach 6 Tagen und zweimaliger Transfektion zu.

2.4.2 Hemmung der p65-Untereinheit auf Protein-Ebene

Die Inhibition von p65 auf Proteinebene wurde über Western-Blot-Analysen untersucht. Hierzu wurden 3 Tage und 6 Tage nach Transfektion der 1205Lu Zellen mit p65 siRNA oder Kontroll-siRNA Gesamtproteinextrakte isoliert und im Western-Blot analysiert (Abbildung 22). Um den gleichen Proteingehalt der einzelnen Banden zu überprüfen, wurde das konstant exprimierte β -Aktin analysiert (Ladekontrolle).

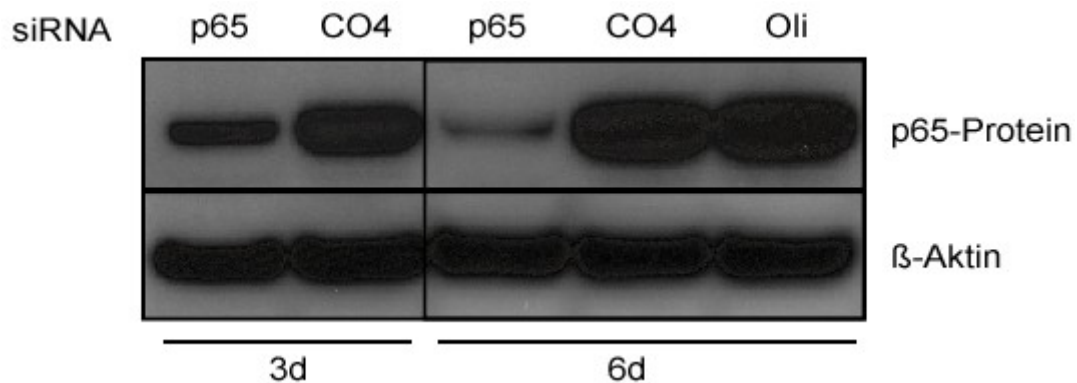


Abb. 22: Analyse der p65-Protein-Expression in Melanomzellen über Western-Blot 3 Tage und 6 Tage nach Transfektion mit p65 siRNA

1205Lu Melanomzellen wurden mit p65 siRNA (p65) oder Kontroll-siRNA (CO4) transfiziert und 3 Tage und 6 Tage nach der ersten Transfektion auf p65-Protein untersucht. Eine Retransfektion erfolgte nach 3 Tagen. In einem weiteren Ansatz (Oli) wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagens behandelt. Transfektionen erfolgten jeweils mit 6 µl Oligofectamine und einer siRNA-Konzentration von 240 nM. Pro Ansatz wurden 10 µg Proteinlysate eingesetzt. Als Primärantikörper diente ein gegen p65 gerichtetes IgG vom Kaninchen (1:200); als Sekundärantikörper wurde ein anti-Kaninchen IgG von der Ziege (1:1.000) verwendet. Die Detektion von β-Aktin (interner Standard) diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung mittels siRNA bereits nach 3 Tagen zu einer deutlichen Reduktion der Menge an p65-Protein in 1205Lu-Zellen führte. Nach 6 Tagen ließ sich eine weitere Reduktion des p65-Proteins um mehr als 50% nachweisen.

2.4.3 Expression von NFκB-Zielgenen nach Inhibition der p65-Untereinheit

2.4.3.1 IL-8-Expression

Nachdem eine effiziente Hemmung von p65 auf mRNA- und Proteinebene demonstriert werden konnte, wurde der Einfluss der p65-Inhibition auf die Expression von Zielgenen von NFκB anhand von IL-8 untersucht.

Es wurden zwei verschiedene Transfektionsmittel, Oligofectamine und RNAiMax, verwendet und die siRNAs in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Bei der Verwendung von Oligofectamine ergab die siRNA-Konzentration von 60 nM eine vergleichbare Effizienz wie 240 nM, so dass in den folgenden Versuchen siRNAs in einer Konzentration von 60 nM eingesetzt wurden.

Der Effekt der p65-Hemmung mittels siRNA auf die Expression von IL-8 in 1205Lu Melanomzellen ist in Abbildung 23 dargestellt.

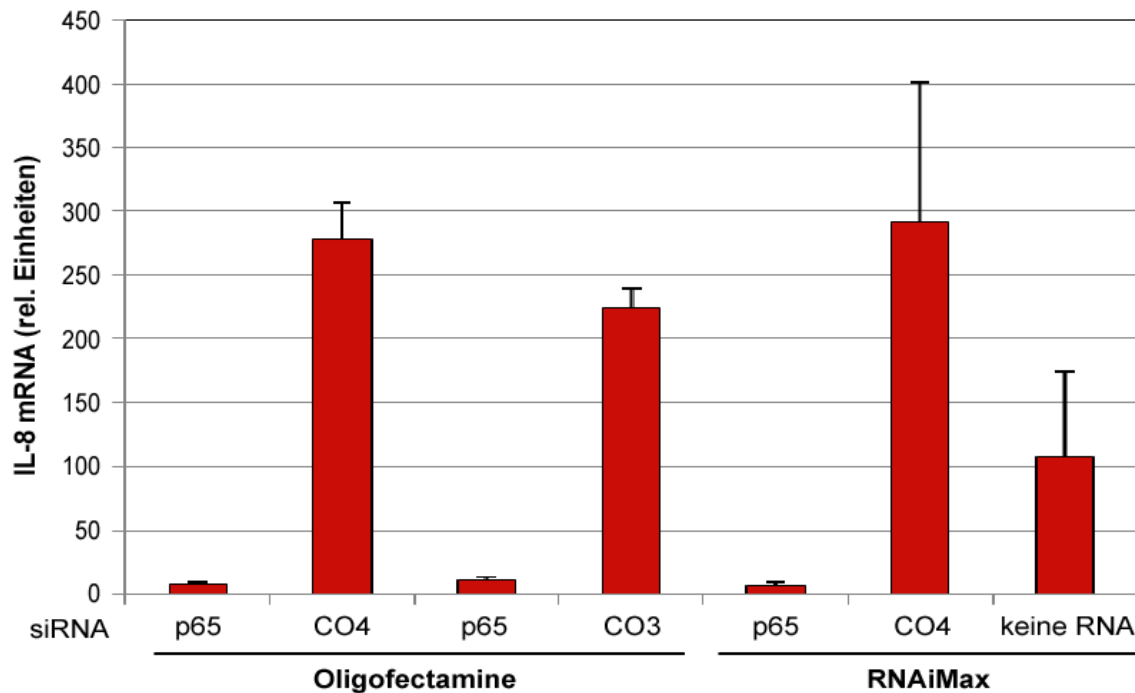


Abb. 23: RT-PCR-Analysen der IL-8-Expression in 1205Lu Melanomzellen 6 Tage nach Transfektion mit p65 siRNA

Nach Transfektion der Zellen mit p65 siRNA (p65), Kontroll-siRNA (CO4, CO3) oder der Zugabe des Transfektionsmittels alleine (keine RNA) erfolgte nach 72 h eine Retransfektion. Für Transfektionen mit Oligofectamine wurde siRNA in Konzentrationen von 60 nM, für Transfektionen mit RNAiMax wurde siRNA in Konzentrationen von 20 nM eingesetzt. 72 h nach Retransfektion erfolgte die RNA-Extraktion und Analyse der IL-8 Expression mit Hilfe der RT-PCR. Die IL-8 mRNA wurde mit der mRNA des dauerhaft exprimierten Gens HPRT normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

6 Tage nach Transfektion mit p65 siRNA zeigte sich eine sehr starke Reduktion der IL-8 mRNA-Expression gegenüber den Kontrollansätzen.

Unter Verwendung von Oligofectamine und einer siRNA-Konzentration von 60 nM war die Menge an IL-8-mRNA um ca. 97% im Vergleich zu den Kontrollen CO4 reduziert und um etwa 95% im Vergleich zu den Kontrollen CO3. Unter Verwendung von RNAiMax betrug die Reduktion von IL-8-mRNA bei einer siRNA-Konzentration von 20 nM gegenüber den Kontrollen (CO4) etwa 98%. Beim Vergleich mit Ansätzen ohne siRNA zeigte es sich, dass beide Kontroll-siRNAs (CO3, CO4) auf die IL-8-mRNA eine induzierende Wirkung hatten. Trotzdem war die IL-8-Expression bei p65-Hemmung auch gegenüber unbehandelten Zellen deutlich reduziert (95%).

Der Effekt der p65-Hemmung auf das NF κ B-Zielgen IL-8 mittels siRNA ist darüber hinaus auch an der Zelllinie WM239A untersucht worden. Dabei wurde als Transfektionsmittel Oligofectamine verwendet und siRNA-Konzentrationen von 60 nM eingesetzt. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der IL-8-mRNA-Expression in p65-gehemmten WM239A-Zellen gegenüber Kontrollen (CO4) um 79% (Ergebnisse nicht gezeigt).

2.4.3.2 IL-1 β -Expression

Die Expression eines weiteren Zielgens von NF κ B, IL-1 β ,¹⁹² wurde analog zu IL-8 nach Inhibition von p65 mittels siRNA untersucht (Abbildung 24).

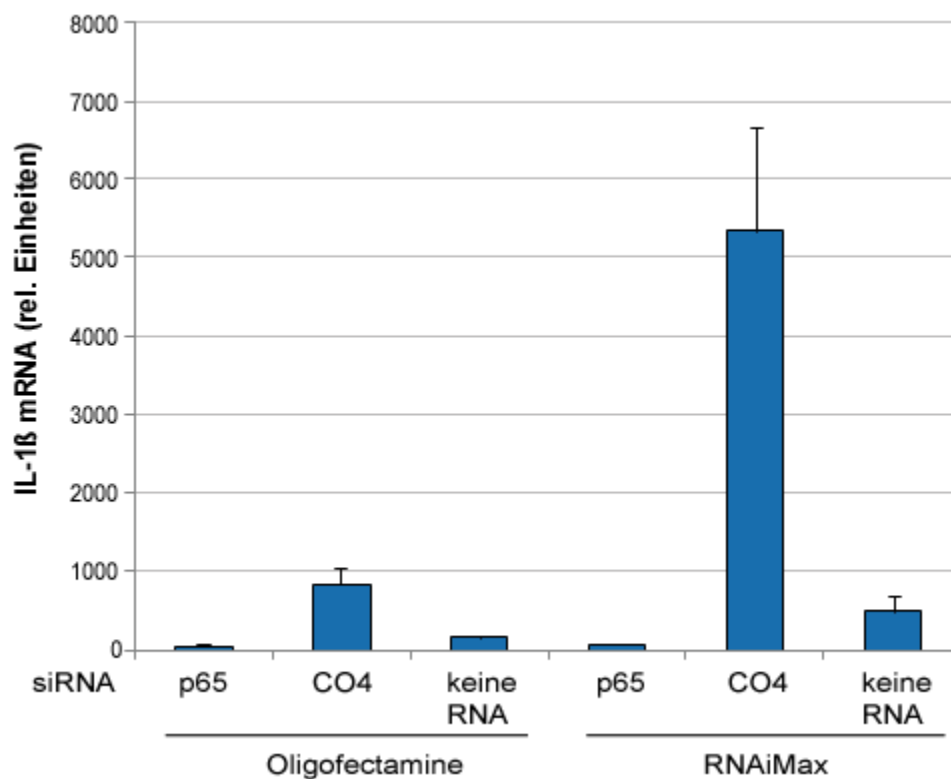


Abb. 24: IL-1 β mRNA-Expression in 1205Lu-Melanomzellen 6 Tage nach Transfektion mit p65 siRNA

Transfektionen und RT-PCR-Analysen erfolgten analog zu den Bedingungen und Analysen von IL-8 (siehe Abb. 23). Die IL-1 β -mRNA wurde mit der mRNA des beständig exprimierten HPRT-Gens normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

RT-PCR-Analysen des IL-1 β -Gens zeigten ebenfalls eine starke Reduktion der IL-1 β -mRNA nach Transfektion mit p65 siRNA im Vergleich zu den Kontrollen.

Unter Verwendung des Transfektionsmittels Oligofectamine war die IL-1 β -mRNA im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen um 93% reduziert.

Unter Verwendung von RNAiMax war IL-1 β -mRNA um etwa 98% reduziert im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen.

Analog zu den IL-8-Expressionsanalysen fiel auch hier auf, dass die IL-1 β -Expression in Ansätzen mit unspezifischer siRNA deutlich höher war als in Ansätzen ohne siRNA. Dennoch war auch hier die IL-1 β -Expression nach p65-Hemmung gegenüber unbehandelten Zellen deutlich reduziert (65% bei Verwendung des Transfektionsmittels Oligofectamine; 83% bei Verwendung von RNAiMax).

3 Biologische Aktivität von NF κ B

Durch Hemmung von p65 mittels RNA-Interferenz wurde eine geeignete Methode etabliert, um aktiviertes NF κ B in Melanomzellen zu inhibieren. Nun sollte über Funktionsanalysen die Frage geklärt werden, welche biologische Funktion NF κ B in Melanomzellen hat.

3.1 Analysen von Apoptose und Zellproliferation

Zahlreiche Studien haben bislang gezeigt, dass NF κ B durch Induktion anti-apoptotischer Gene die Apoptose verhindern kann.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Ebenso kann eine vermehrte NF κ B-Aktivierung über die Dysregulation von Zellzyklus-Regulationsproteinen wie Cyclin D1 und Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK2) eine proliferationsfördernde Wirkung auf Zellen haben.^{171, 196}

In dieser Arbeit wurden daher die Apoptoserate und Proliferationsfähigkeit von Melanomzellen nach Hemmung von NF κ B mittels RNA-Interferenz wie oben beschrieben untersucht. Die Studien erfolgten an den Zelllinien 1205Lu, WM35 und WM239A. Als Transfektionsreagenz wurde Oligofectamine verwendet. Zellen wurden dabei alle 72 h retransfiziert und alle 6 Tage auf zwei T-75 Kulturfラスchen unter Mediumwechsel gesplittet.

Auch nach 18 Tagen zeigten sich in Ansätzen, die mit p65-spezifischer siRNA inkubiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsrate.

In weiteren Experimenten wurde durch Zugabe der proapoptotischen Substanz Staurosporin (STS) zum Kulturmedium die Empfindlichkeit der Melanomzellen gegenüber einer Apoptoseinduktion unter p65-Hemmung untersucht. Unterschiedliche, subletale Konzentrationen von STS (0 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM) zeigten aber keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen p65-gehemmten Zellen und den Kontrollzellen.

Die Untersuchungen ergaben insgesamt, dass p65 beim malignen Melanom keine wichtige Rolle für das Überleben und die Zellproliferation spielt.

3.2 Invasionsanalysen

Die Beteiligung des durch NF κ B regulierten Chemokins IL-8 an den metastatischen Eigenschaften unterschiedlicher Tumoren wurde bisher von mehreren Studien bestätigt.^{48, 197-200}

Neben einer erhöhten IL-8-Expression, ist in metastatischen Melanomzellen vermehrt die ebenfalls durch NF κ B regulierte Typ II Metalloproteinase (MMP-2) nachgewiesen worden, welche über Matrixdegradation die Invasion des Wirtsstromas durch Tumorzellen begünstigt.⁴³

Der Einfluss von p65 auf das Invasionsverhalten von Melanomzellen wurde über den Matrigel-Invasions-Assay analysiert (siehe Abbildung 25). Die Studien erfolgten mit den metastatischen Zelllinien 1205Lu und WM239A, welche vor Einsatz ins Matrigel zweimal mit p65 siRNA beziehungsweise mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Mit dem Einsatz der Zellen ins Matrigel erfolgte eine weitere Transfektion der Zellen mit siRNA.

Abbildung 25 zeigt mikroskopische Aufnahmen von der Unterseite der Transwellmembran mit durch das Matrigel und die Membran migrierten Melanomzellen.

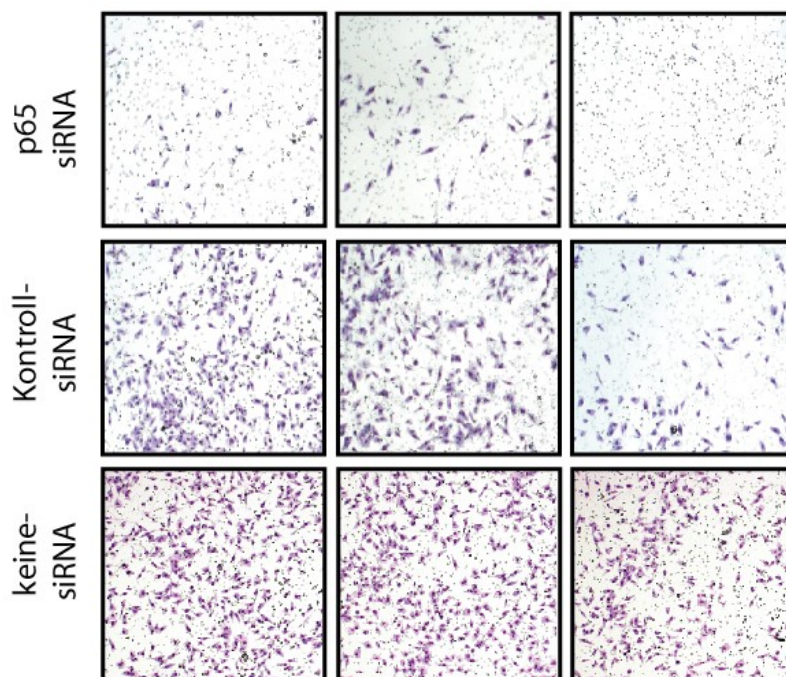


Abb. 25: Invasionsverhalten der metastatischen Melanomzelllinie 1205Lu durch ein Matrigel nach 72 Stunden

Gezeigt sind je drei repräsentative Ansätze von 1205Lu Melanomzellen, welche mit p65 siRNA, Kontroll-siRNA oder mit dem Transfektionsmittel alleine (keine siRNA) transfiziert wurden (siRNA-Konzentration 60 nM). Sie demonstrieren die Invasion der Zellen durch die künstliche Basalmembran. Nach zweimaliger Transfektion mit p65-, Kontroll-siRNA beziehungsweise nur

Transfektionsmittel Oligofectamine im Abstand von 72 h wurde unmittelbar vor dem Einbringen der Zellen ins Matrigel eine weitere Transfektion durchgeführt. Nach 72 h erfolgte die Auszählung der an die Unterseite der Membran durchgewanderten Zellen (200-fache Vergrößerung).

Die Wanderung der Zellen durch das Matrigel und die Transwellmembran war nach 72 h in den p65-gehemmten Melanomzellen im Vergleich zu den beiden Kontrollansätzen deutlich reduziert.

Die Auszählung der durch das Matrigel gewanderten Zellen ist in Abbildung 26 dargestellt.

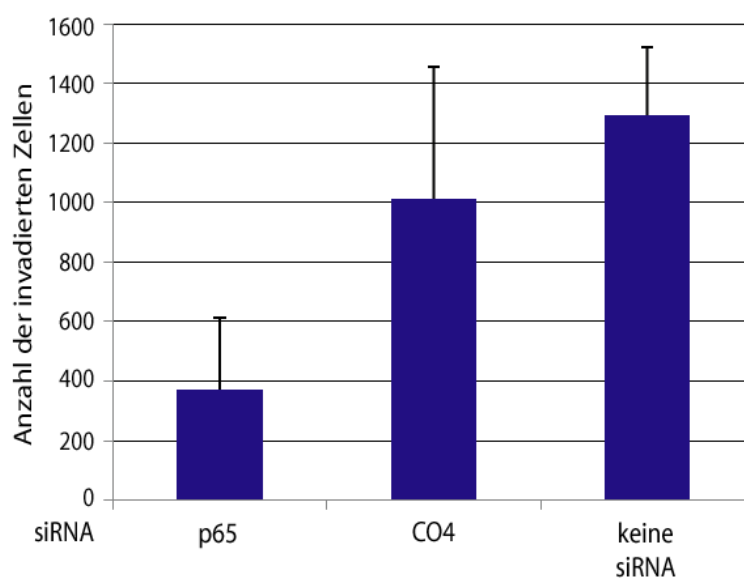


Abb. 26: Auswertung des Invasions-Assays

Die quantitative Auswertung der Matrigel-Invasions-Assays ergab einen deutlichen Unterschied im Invasionsverhalten von 1205 Lu Melanomzellen, die mit p65 siRNA behandelt wurden im Gegensatz zu den Kontrollen CO4 beziehungsweise Ansätzen, in welchen nur Transfektionsmittel verwendet wurde (keine siRNA). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Auszählungen aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Der Unterschied der Invasivität nach p65-Hemmung im Vergleich zu den Kontrollen CO4 betrug 63%. Im Vergleich zu Ansätzen mit ausschließlicher Verwendung von Oligofectamine betrug der Unterschied in der Anzahl der transmigrierten Zellen 71%.

Die im Rahmen des Invasionsassays im Matrigel eingesetzten Zellen der Linie WM239A wanderten nicht durch die Transwellmembran und waren damit für weitere Invasionsanalysen ungeeignet.

DISKUSSION

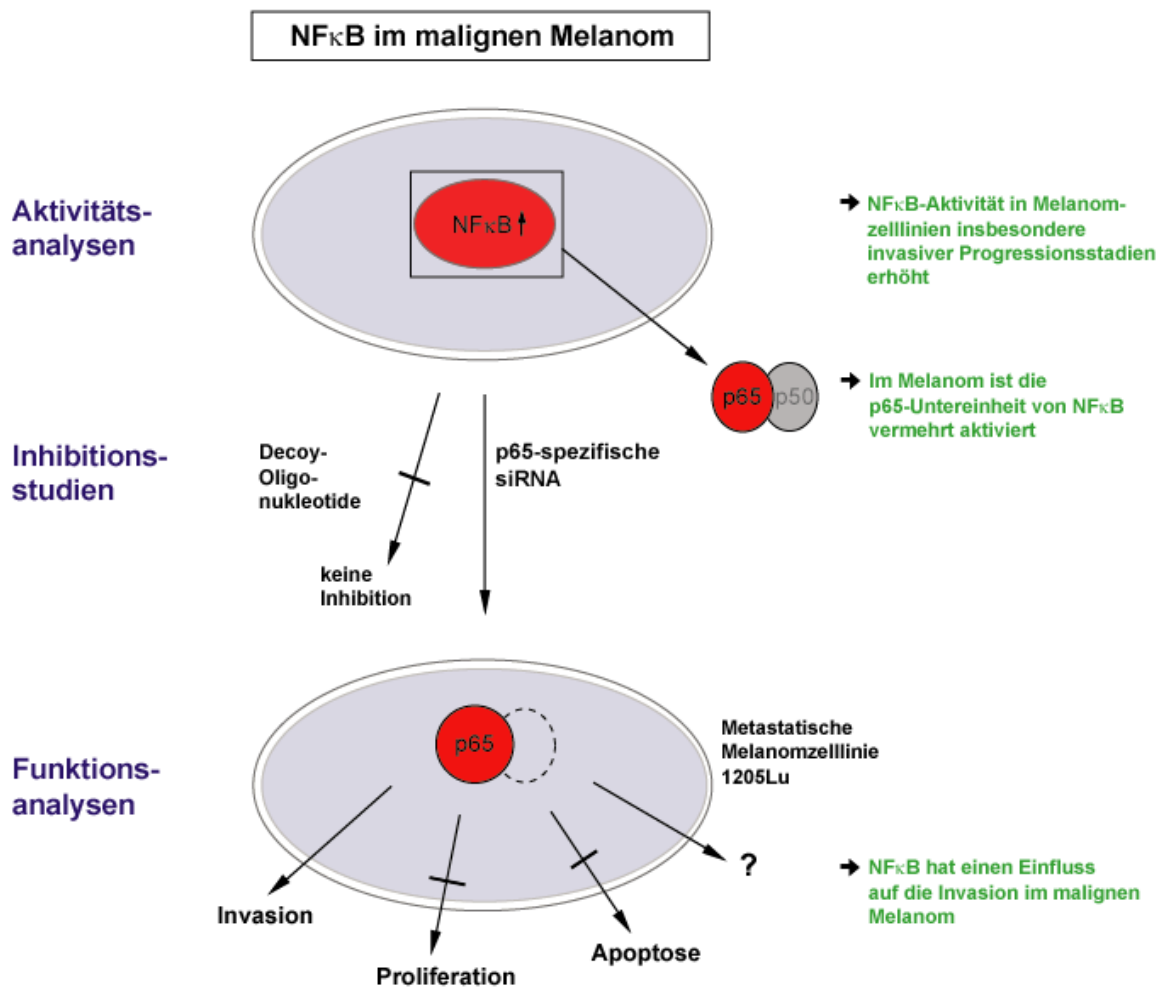


Abb. 27: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

1 Charakterisierung der NF κ B-Aktivierung

1.1 Charakterisierung der NF κ B-Aktivierung über EMSA

EMSA-Analysen an Nuklearextrakten aus Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstufen zeigten eine deutliche Zunahme der NF κ B-Bindungsaktivität insbesondere in invasiven und metastatischen Melanomzelllinien gegenüber normalen humanen Melanozyten.

Bei sechs von neun Melanomzelllinien, die im EMSA eine vermehrte Signalintensität der an das NF κ B gebundenen Sonde zeigten, konnten zwei und in einigen

Melanomzelllinien drei spezifische Banden beobachtet werden, was auf das Vorliegen unterschiedlicher Untereinheiten von NFκB hindeutet.

Diese Analysen erlauben zwar eine vergleichende qualitative Aussage über die Bindungsaktivität von NFκB, jedoch können daraus noch keine Rückschlüsse auf die genaue Zusammensetzung des bindenden Transkriptionsfaktors gezogen werden.

NFκB ist ein Dimer, das aus einer ganzen Reihe von strukturell verwandten Molekülen gebildet werden kann. Zur NFκB-Familie gehören neben p50 (NFκB1) und p65/ RelA auch c-Rel, RelB und p52.⁹⁵ Die zwischen diesen Untereinheiten bestehenden Kombinationsmöglichkeiten schließen eine Reihe theoretisch möglicher Homo- und Heterodimere ein, was in der Gelretardation zum Auftreten mehrerer Banden führen kann.

Einen Hinweis darauf, dass es sich bei der am schnellsten migrierenden Bande (siehe Ergebnisteil 1.1, mit einem Stern markierte Bande) um eine unspezifische Bande handelt, lieferten Spezifitätskontrollen unter Verwendung von Kontroll-Oligonukleotiden, welche nur die Bildung der zwei beziehungsweise drei langsamer migrierenden Banden verhinderten. Vor diesem Hintergrund kann davon ausgegangen werden, dass es sich lediglich bei den zwei beziehungsweise drei langsamer migrierenden Banden (siehe Ergebnisteil 1.1, mit einem Pfeil markierte Banden) um eine der fünf Untereinheiten von NFκB handelte.

Die zur genaueren Charakterisierung der bindenden Transkriptionsfaktoren durchgeführten Supershift-Analysen mit Antikörpern gegen p50 und p65 haben gezeigt, dass es sich bei der oberen spezifischen Bande um einen p65-haltigen- und bei der darunter gelegenen Bande um einen p50-haltigen NFκB-Komplex gehandelt haben muss.

Aus diesen Befunden kann man schließen, dass es sich bei den an die Sonden-DNA-gebundenen NFκB-Komplexen zumindest zum Teil um p65/ p50-Dimere handeln muss. Die Tatsache, dass beispielsweise der p50-Antikörper nicht die gesamte langsamer migrierende Bande shiften konnte, weist darauf hin, dass hier neben p50/ p65-Dimeren entweder p65-Homodimere oder Komplexe aus p65 und einer anderen NFκB-Untereinheit vorgelegen haben müssen. Analoges gilt für die schneller migrierende Bande beim Einsatz des p65-Antikörpers.

Eine vermehrte Aktivierung von NFκB konnten andere Arbeitsgruppen bei anderen Melanomzelllinien feststellen. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die bislang untersuchten Melanomzelllinien, die eine erhöhte NFκB-Aktivität gegenüber der entsprechenden Referenzzelllinie zeigten.

Melanomzelllinien	Referenzzelllinien	Referenzen
Hs294T	ARPE	Shattuck-Brandt et al. 1997 ²⁰¹
C81-46A	Humane Melanozyten	Meyskens et al. 1999 ²⁰²
C81-61		
C83-2C		
A375SM	A375P	Huang et al. 2000 ²⁰³
A375-C28	A375-C5	

Tab. 12: Übersicht über die bisher bezüglich der NFκB-Aktivität analysierten Melanomzelllinien

Bei den bisher untersuchten Melanomzelllinien handelte es sich ausschließlich um Zelllinien des metastatischen Progressionsstadiums. In der Studie der Arbeitsgruppe um Huang handelte es sich um den Vergleich der NFκB-Aktivität zwischen den hochgradig metastatischen Zelllinien A375SM und A375-C28 gegenüber den niedriggradig metastatischen Zelllinien A375P und A275-C5. Abkürzungen: ARPE: Normale retinale Pigmentepithelzellen.

Die bei einigen Melanomzelllinien aufgetretene, am langsamsten wandernde dritte Bande wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Bei der Durchsicht der Literatur fanden sich in anderen EMSA-Analysen zur NFκB-Aktivierung jedoch stets nur zwei spezifische Banden.^{160, 201, 204, 205} Es wäre in unserem Fall möglich, dass es sich bei der dritten Bande um einen weiteren, für die entsprechenden Zelllinien relevanten NFκB-Komplex mit einer anderen Untereinheit handelt.

Supershift-Analysen hinsichtlich anderer Untereinheiten wie c-Rel (früher auch p75, MG 75 kD) oder p52 an der Zelllinie Hs294T ergaben, dass die Aktivität von c-Rel in Melanomzellen entweder signifikant erniedrigt war oder kaum vorkam. Ferner wurde gezeigt, dass p52 ebenfalls in nicht relevanten Mengen aktiviert vorlag.^{201, 204}

Es ist jedoch auch möglich, dass die Diskrepanz zwischen unserem Befund und den Ergebnissen anderer Studien hinsichtlich dieser dritten Bande in zelllinienspezifischen Unterschieden begründet liegt, was im Rahmen zukünftiger Studien geklärt werden müsste.

1.2 Charakterisierung der NFκB-Aktivierung über ELISA

Bei der genaueren Charakterisierung von p50 und p65 mittels ELISA stellte sich heraus, dass p65 im Gegensatz zu p50 die im Melanom entscheidende, aktivierte Untereinheit des NFκB-Dimers ist. p65 zeigte im Gegensatz zu normalen humanen Melanozyten in Melanomzelllinien nicht-invasiver, invasiver und metastatischer Phasen eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität. Diese war in invasiven Zelllinien besonders stark ausgeprägt und nahm bei metastatischen Zelllinien wieder ab (siehe Ergebnisteil 1.3,

Abbildung 15). Hingegen fand sich p50 in allen untersuchten Melanomzelllinien etwa auf dem gleichen Niveau aktiviert wie in Melanozyten (siehe Ergebnisteil 1.3, Abbildung 14).

Die ELISA-Analysen der häufigsten Untereinheiten von NFκB, p65 und p50 erlaubten anhand der semiquantitativen Daten eine deutliche Unterscheidung dieser Untereinheiten in Bezug auf ihre jeweilige DNA-Bindungsfähigkeit.

Bei den Untersuchungen der DNA-Bindungsaktivität von p65 in 3 verschiedenen Melanozytenzelllinien zeigte sich bei HM9 im Vergleich zu HM47 und HM84 eine auffällig hohe p65-Aktivität (Mittelwert (MW) HM9: 0,124; versus MW HM47: 0,036 und MW HM84: 0,047). Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen der EMSA-Analysen, in welchen die Melanozyten HM9 keine Aktivität zeigten (Abbildung 12). Eine mögliche Ursache für die auffällig hohen Werte von HM9 im ELISA könnte eine bakterielle Kontamination der Zellkultur gewesen sein, welche dann zu einer Aktivierung von NFκB geführt hatte, zumal das verwendete Melanozytenmedium keine Antibiotikazusätze enthielt. Aufgrund dieser widersprüchlichen Messergebnisse wurde HM9 nicht als Referenz zur Signifikanzberechnung verwendet.

Die Aktivierung von NFκB in verschiedenen Zelltypen wurde bereits in einigen Studien mittels der ELISA-Methode untersucht.²⁰⁶⁻²⁰⁸ Studien, die die DNA-Bindungsaktivität verschiedener NFκB-Untereinheiten im Melanom charakterisiert haben, sind in der Literatur hingegen bislang rar. Untersuchungen von Meyskens et al. über die NFκB-Aktivierung in den Melanomzelllinien c81-46A, c81-61 und c83-2C, ermittelt über EMSA und quantitative Laser-Densitometrie, zeigten zunächst eine etwa 4-fach erhöhte DNA-Bindungsaktivität von NFκB in Melanomzellen im Gegensatz zu normalen humanen Melanozyten.²⁰² Später zeigte dieselbe Arbeitsgruppe über Western-Blot-Analysen, dass in diesen drei Melanomzelllinien das cytoplasmatische p65-Protein 9-fach und das p50-Protein 3-fach höher exprimiert wurde. Im Nukleus dieser Melanomzellen wurde das p65-Protein 5-10-fach und das p50-Protein 7-fach erhöht nachgewiesen.²⁰⁵ Da jedoch eine vermehrte Expression des NFκB-Proteins nicht zwingend mit einer erhöhten DNA-Bindungsfähigkeit einhergeht, ist ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt möglich.

Die hohe DNA-Bindungsfähigkeit der p65-Untereinheit von NFκB in invasiven Melanomzelllinien und der Rückgang der Bindungsfähigkeit in metastatischen Zelllinien könnte darauf zurückzuführen sein, dass die für den Invasionsprozess der VGP-Melanomzellen relevante Aktivierung von p65 durch die unmittelbare Mikroumwelt induziert wird, welche sich durch gewebs- und organspezifische Zytokine auszeichnet, während bereits metastasierte Zelllinien diesem Aktivierungsmechanismus nicht mehr

unterliegen. Bislang liegen keine weiteren Studien vor, in welchen die DNA-Bindungsaktivität von p65 in Melanomzelllinien invasiver und metastatischen Progressionsstadien untersucht und verglichen worden wäre.

2 NFκB-Inhibition

2.1 Hemmung von NFκB mittels Decoy-Oligonukleotiden

Trotz einer erfolgreichen Aufnahme in die Zellen und einer über 72 h hinaus anhaltenden Stabilität der Decoy-Oligonukleotide innerhalb der Zellen, konnte eine Hemmung des NFκB-Zielgens IL-8 durch NFκB-Decoy-Oligonukleotide im Vergleich zu Kontroll-Oligonukleotiden nicht festgestellt werden (siehe Ergebnisteil 2.2).

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Daten mehrerer Studien, die eine effiziente Hemmung von NFκB mittels Phosphorothioat-modifizierter Decoy-Oligonukleotide in einer Reihe von Pathologien wie Glomerulonephritis,²⁰⁹ rheumatoide Arthritis,²¹⁰ atopische Dermatitis²¹¹ oder Myokardinfarkt²¹² in ähnlichen Konzentrationen demonstrierten. Die in diesen Studien verwendete Sequenz der Decoy-Oligonukleotide entsprach dabei der Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten Decoy-Oligonukleotide. Ein in der Literatur beschriebenes mögliches Problem mit Decoy-Oligonukleotiden besteht darin, dass doppelsträngige Kontroll-Oligonukleotide mit irrelevanter Bindungssequenz dennoch eine hohe, unspezifische NFκB-Bindung aufweisen können und damit zu einer unerwünschten Hemmung der Zielgentranskription beitragen können.²¹³ Dies könnte den Decoy-ODN bedingten Hemmeffekt überdecken und passt zur Beobachtung, dass die IL-8 Expression in Kontrollansätzen sogar niedriger war als in den Decoy-Ansätzen (siehe Abbildungen 18, 19).

2.2 Hemmung von NFκB mittels siRNA

2.2.1 Effizienz der p65-Inhibition auf mRNA- und Protein-Ebene

Eine effiziente Hemmung von p65 wurde in der vorliegenden Arbeit mittels siRNA-Interferenz erreicht. 48 h nach Transfektion der Zelllinien 1205Lu und WM239A mit p65-siRNA zeigte sich eine Reduktion der p65-mRNA um 32% (WM239A) beziehungsweise 69% (1205Lu). Nach einer zweiten Transfektion nahm die Hemmung nach 6 Tagen um weitere 16% (WM239A) beziehungsweise 7% (1205Lu) zu.

Damit konnte auf mRNA-Ebene eine effiziente Hemmung der p65-Expression nachgewiesen werden. Diese wurde ferner auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen demonstriert. Nach 3 Tagen zeigte sich hierbei eine deutliche Hemmung des p65-Proteins, welche nach 6 Tagen noch um etwa das 2- bis 3-fache zunahm.

Diese Befunde untermauern die effiziente und nachhaltig andauernde Hemmung von p65 mittels siRNA in Zelllinien des malignen Melanoms.

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Arbeitsgruppe um UN Verma,²¹⁴ die HCT116-Zellen mit siRNA gegen p65 transfizierte und anschließend das p65-Protein nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen analysierte. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erfolgte in dieser Studie die Transfektion lediglich einmal zu Beginn des Experiments. Nach 2 Tagen zeigte sich die p65-Protein-Expression fast vollständig gehemmt. Die Hemmung nahm nach weiteren 2, 4 und 6 Tagen geringgradig zu. Am Tag 10 nach der Transfektion war die p65-Proteinmenge schließlich mit der in den Kontrollansätzen vergleichbar. Diese Ergebnisse wurden in der gleichen Studie durch NFκB-Luciferase-Reportergen-Analysen bestätigt, welche 48 h nach Transfektion mit p65 siRNA eine 50%ige Reduktion der NFκB-Aktivität nachwiesen.

In einer anderen Arbeit wurde eine ähnlich hohe Effizienz der siRNA-vermittelten p65-Hemmung in Pankreaskarzinomzellen demonstriert. Hierbei war nach 3 Tagen p65 auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar.²¹⁵

2.2.2 Inhibition von NFκB-Zielgenen mittels siRNA

Die Effizienz der p65-Inhibition mittels siRNA wurde weiterhin anhand der verminderten Expression von zwei NFκB-Zielgenen dargestellt. 6 Tage nach Transfektion mit siRNA gegen p65 war die Expression von IL-8, insbesondere bei Verwendung des Transfektionsmittels RNAiMax nahezu vollständig gehemmt. Ähnliche Ergebnisse lieferten RT-PCR-Analysen von IL-1β.

Die Hemmung eines Proteins über RNA-Interferenz bedeutet, dass dieses zunächst auf mRNA-Ebene reduziert wird. Das bereits transkribierte Protein muss erst weitgehend abgebaut werden, bevor die hemmende Wirkung auf die Genaktivierung eintritt. Dies steht im Gegensatz zur Decoy-Strategie, die durch kompetitive Bindung des Transkriptionsfaktors auf Proteinebene eine sofortige Hemmung der Gentranskription zur Folge hat.

Die fast vollständige Suppression von IL-8 und IL-1β demonstriert zum einen die hohe Effizienz der p65-Hemmung mittels RNA-Interferenz. Zum anderen wird deutlich, dass NFκB der entscheidende Regulator der IL-8- und IL-1β-Expression beim malignen Melanom ist.

Die beobachteten höheren Mengen an IL-8-mRNA in Kontrollansätzen mit unspezifischer siRNA im Vergleich zu Kontrollansätzen mit Transfektionsreagenz (RNAiMax) allein (Abbildung 23) sind wahrscheinlich durch eine unspezifische Induktion von IL-8 durch die Kontroll-siRNA zu erklären. Aus diesem Grund sind weitere Analysen durchgeführt worden, in welchen eine andere Kontroll-siRNA (CO3)

verwendet wurde. Diese Untersuchungen zeigten jedoch eine ähnlich ausgeprägte IL-8-Induktion durch die Kontroll-siRNA (CO3). Die IL-8-Induktion scheint damit eine unspezifische Wirkung von siRNA auf NF κ B-Zielgene zu sein. In dieser Arbeit wurde auf die weitere Untersuchung dieser unspezifischen Wirkung von siRNA nicht weiter eingegangen. Trotzdem war die IL-8-Expression nach p65-Hemmung auch gegenüber unbehandelten Zellen sehr deutlich reduziert (95%, Abb. 23). Analoge Ergebnisse zeigten sich bei Untersuchungen von IL-1 β . Somit erschienen weitere Analysen der Effekte einer p65-Hemmung sinnvoll.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Transfektionsreagentien Oligofectamine und RNAiMax wurden mit RNAiMax bei einer höheren Hemmeffizienz wesentlich niedrigere siRNA-Mengen (2,75 μ l statt 12 μ l) benötigt. Eine geringere Zelltoxizität durch den Einsatz niedrigerer siRNA-Mengen sowie ökonomische Aspekte sprechen demnach für die Verwendung von RNAiMax in zukünftigen Experimenten.

2.2.3 Regulation der IL-8-Expression durch NF κ B im malignen Melanom

In-vitro und In-vivo-Studien haben gezeigt, dass die vermehrte Expression von IL-8 in humanen Melanomzellen mit ihrem Metastasierungspotential korreliert.^{43, 48, 216} Dabei bewirkt eine vermehrte Expression von IL-8 in SB-2-Melanomzellen, wie die Arbeitsgruppe um M Bar-Eli demonstriert hat, eine Zunahme ihres metastatischen Potentials in nackten Mäusen, was eine Beteiligung von IL-8 an der Invasion und Metastasierung beim malignen Melanom nahelegt. Hierbei stellt sich jedoch weiterhin die Frage nach dem Mechanismus, der zur Induktion von IL-8 führt. Die nahezu vollständige Hemmung der IL-8-Expression durch den Einsatz von siRNA gegen die p65-Untereinheit von NF κ B im Rahmen dieser Arbeit zeigt, dass NF κ B eine entscheidende Rolle bei der Regulation von IL-8 spielt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Studie von C Kunsch und CA Rosen, die in ihren Untersuchungen gezeigt haben, dass es RelA-Homodimere sind, welche die IL-8-Genexpression durch Bindung an das κ B-Element im IL-8-Promotor regulieren, während p50/p50-Homodimere und p65/p50-Heterodimere nicht an der IL-8-Regulation beteiligt waren.²¹⁷ Eine weitere Studie von Huang et al. wies an metastatischen Melanomzellen nach, dass die Bindung von NF κ B an spezielle κ B-Bindungsstellen im IL-8-Promotor für eine dauerhafte Aktivierung des IL-8-Promotors essentiell ist. Darüber hinaus zeigte diese Studie, dass eine Hemmung von NF κ B zu einer signifikanten Reduktion sowohl der IL-8-Promotoraktivität als auch der IL-8-Expression führte.²¹⁸

3 NFκB-Funktionsanalysen

Die funktionellen Konsequenzen der p65-Hemmung wurden anhand von Proliferations- und Invasionsanalysen näher beleuchtet.

3.1 Untersuchungen zur Apoptose und Proliferation

Die Hemmung von p65 in 1205Lu-, WM35- und WM239A-Zellen zeigte im Hinblick auf die Apoptoserate gegenüber den Kontrollen keine signifikanten Unterschiede.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Studien mit anderen Zellen, in welchen die Hemmung von p65 eine Apoptoseinduktion zur Folge hatte. So zeigte die Arbeitsgruppe um AS Baldwin an Embryofibroblasten aus p65^{-/-}-Knockout-Mäusen, dass die fehlende Expression von p65 diese Zellen gegenüber TNF-bedingter Apoptose sensibilisierte.¹⁷⁰ Weiterhin demonstrierte die Arbeitsgruppe um X Chen, dass eine Überexpression von p65 in Mausembryo-Fibroblasten die Apoptose verhinderte, während eine Hemmung von p65 zu einer vermehrten, durch Zytokine induzierbaren Apoptose führte.²¹⁹ Analoge Untersuchungen in Bezug auf die c-Rel-Untereinheit lieferten hinsichtlich der Apoptoseinduktion genau entgegengesetzte Ergebnisse.²¹⁹

Eine weitere Studie wies durch Inhibition der IKKβ-Kinase mittels des spezifischen Inhibitors BMS-345541 in SK-Mel-5-Melanomzellen, neben einer starken Reduktion der NFκB-Aktivität, eine Apoptoseinduktion in vitro und in vivo nach. Darüber hinaus zeigten Funktionsuntersuchungen an den Melanomzelllinien SK-MEL-5 sowie A375 und Hs294T eine Inhibition der Zellproliferation.²²⁰

Eine relativ neue Studie könnte diese Diskrepanz erklären. Hier wurde die IKKβ-Aktivität in den Melanomzelllinien A375, Mel-2a, SK-Mel-23, Mel-HO, MeWo, MV3, LOX, Brown und MMNH mit einem neuen Molekül, dem sog. Kinase-Inhibitor von Nuclear Factor-κB (KINK-1) gehemmt. Neben einer signifikanten Inhibition der NFκB-Aktivität, führte die Hemmung mit KINK-1 auch zu einer reduzierten Expression NFκB-regulierter Gene, welche eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, Apoptose und der Zytokinproduktion spielen. Diese indirekte Inhibition von NFκB zeigte kaum anti-proliferative oder pro-apoptotische Wirkung. Erst nach kombinierter Behandlung der Melanomzellen mit KINK-1 und dem Zytostatikum Doxorubicin kam es zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation sowie Apoptoseinduktion in vitro und in vivo. Eine Apoptose konnte auch jeweils mit den cytotoxischen Substanzen Camptothecin und Tamoxifen induziert werden.²²¹

Diese Daten werden von einer weiteren Studie gestützt, die an der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 zeigte, dass die p65-Hemmung mittels siRNA erst nach Zugabe der chemotherapeutischen Substanz Irinotecan eine Apoptose in diesen Zellen induzierte.

In-vivo-Untersuchungen, bei welchen p65-gehemmte HCT116-Zellen subcutan in Mäuse injiziert wurden, wiesen infolge reduzierten Wachstums der inokulierten Tumoren auf einen proliferationshemmenden Effekt der p65-Hemmung. Diese Wirkung wurde allerdings lediglich bei zuvor erfolgter intraperitonealer Injektion von Irinotecan festgestellt, nicht jedoch bei Transfektionen von siRNA gegen p65 alleine.²¹⁴

Aus diesen Daten kann man schließen, dass in einigen Tumoren einschließlich des Melanoms mehrere Mechanismen an der Ausprägung eines Tumormerkmals beteiligt sind und erst durch das kombinierte Angreifen verschiedener Proteine, die beispielsweise die Apoptose in Melanomzellen verhindern beziehungsweise die Proliferation fördern, eine effiziente antitumorale Wirkung erzielt werden kann.

3.2 Invasionsanalysen

Invasionsanalysen an 1205Lu-Zellen zeigten nach Hemmung von p65 mittels siRNA eine deutliche Reduktion der Invasionsfähigkeit der Melanomzellen gegenüber den Kontrollen.

Da siRNA mit unspezifischer Sequenz (CO3, CO4) auch eine induzierende Wirkung auf NFκB zu haben schien, sind ferner Ansätze untersucht worden, in welchen nur das Transfektionsmittel Oligofectamine verwendet wurde. Auch hier zeigte sich im Gegensatz zu Ansätzen mit siRNA gegen p65 eine höhere Anzahl an auf die Membranunterseite durchgewanderten Zellen. Die hierbei höhere Anzahl an transmigrierten Zellen gegenüber Ansätzen mit Kontroll-siRNA (CO4) ist möglicherweise auf das Fehlen der toxischen Wirkung bzw. die Zellmigration hemmenden Wirkung (Off-Target-Effekt) von siRNA zurückzuführen.

Im Gegensatz zur Zelllinie 1205Lu zeigten WM239A-Zellen unter gleichen Bedingungen keine Wanderung durch die Transwellmembran. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen der Arbeitsgruppe um GF Oy²²², die den Einfluss des Proteins IGFBP-3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*) auf die Invasion der Melanomzelllinie WM239A nach Hemmung von IGFBP-3 mittels spezifischer siRNA untersuchte. Die dabei eingesetzte siRNA-Konzentration betrug 50 nM und war damit mit unseren Arbeiten vergleichbar. Die Zellen wurden in der oben genannten Studie nur einmal transfiziert und es erfolgte keine weitere siRNA-Transfektion vor dem Einsatz der Zellen ins Matrigel. Damit hatte in unserer Arbeit möglicherweise das Vorhandensein von siRNA im Matrigel eine ungünstige Wirkung auf die Migration dieser Zelllinie.

Zum anderen bestand auch ein Unterschied in der Zusammensetzung der Kulturmedien, die in den beiden Kammern des Matrigelassays verwendet wurden. Für die innere Kammer wurde in der oben genannten Arbeit das Kulturmedium RPMI1640 mit 5% FKS eingesetzt, während für die äußere Kammer ein angereichertes Medium

aus den Überständen von Fibroblasten mit 10% FKS verwendet wurde, welches als Chemoattraktans wirken sollte. Dieser Konzentrationsgradient zwischen den unterschiedlichen Medien war eventuell essentiell für ein optimales Migrationsverhalten der Zelllinie WM239A.

Die Rolle von NFκB bei der Invasion des malignen Melanoms wurde in der Literatur bislang kaum untersucht. Indirekte Hinweise darauf lieferten Daten der Arbeitsgruppe um Huang, die zeigten, dass die Hemmung der NFκB-Aktivität die Entstehung von Lungenmetastasen wesentlich und die Angiogenese um ca. 50-70% verhindern kann.²⁰³ Erst kürzlich konnte eine andere publizierte Studie unsere Ergebnisse weitestgehend bestätigen. Sie zeigte, dass das NDRG2-Gen durch Unterdrückung der NFκB-Aktivität entscheidend zur Reduktion des Invasionpotentials von B16F10-Mausmelanomzellen beiträgt.²²³

4 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Tumorarten, einschließlich des malignen Melanoms. Der Nachweis, dass NFκB an der Invasion von Melanomzellen in der metastatischen Progressionsphase entscheidend beteiligt ist, könnte bedeuten, dass dieser Transkriptionsfaktor einen besonders günstigen Angriffspunkt für die Therapie von fortgeschrittenen malignen Melanomen darstellt.

Alle Funktionsanalysen bezüglich der Invasion sind an der metastatischen Zelllinie 1205Lu durchgeführt worden. Da zwischen verschiedenen Melanomen häufig eine genetische Heterogenität besteht,²²⁴ wären Untersuchungen an weiteren metastatischen Zelllinien sinnvoll, um die Rolle von NFκB bei der Invasion von Melanomzellen im Allgemeinen besser beurteilen zu können.

Im nächsten Schritt könnten NFκB-Funktionsanalysen an zunehmend komplexeren Systemen erfolgen. Hier würden sich beispielsweise dreidimensionale Hautrekonstrukte anbieten, mit Hilfe derer sich die natürliche Umgebung der Melanomzellen mit ihren Zellmatrix- und Zell-Zell-Interaktionen simulieren ließe. Zudem könnten hiermit auch Zellkulturartefakte erheblich reduziert werden.²²⁵

Diesen Experimenten könnten Langzeit-in-vivo-Untersuchungen folgen, indem die Hautrekonstrukte auf immunodefiziente Mäuse transplantiert würden. Dabei könnte man die biologischen Eigenschaften von Melanomzellen, die zuvor mit siRNA gegen p65 behandelt wurden, mit unbehandelten Melanomzellen vergleichen. Auch wären Experimente mit intravenösen Injektionen von p65- beziehungsweise Kontroll-siRNA nach erfolgreicher Transplantation von Melanomen in Hautrekonstrukten denkbar. Histologische Analysen der Transplantat-Modelle sowie einiger typischer

Metastasierungsorte könnten weitere Aufschlüsse bezüglich der Rolle von NF κ B bei der Tumorinvasion und Metastasierung liefern.

Eine mögliche Erweiterung dieser In-vivo-Experimente wäre die Kombination der In-vivo-siRNA-Gabe mit cytostatischen Agentien wie etwa Temozolomid, Cisplatin oder Paclitaxel. Damit ließe sich die durch Zytostatika häufig verursachte NF κ B-Induktion reduzieren und so möglicherweise eine vermehrte Sensibilität der Zellen gegenüber pro-apoptotischen Effekten von Chemotherapeutika erzielen.

Sollte die Weiterentwicklung der siRNA schließlich ihre Anwendung in klinischen Studien möglich machen, sollten neben den antitumoralen auch immunologische Konsequenzen p65-Hemmung geprüft werden.

Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung wäre darüber hinaus ein selektiver, das heißt auf hoher Affinität der siRNA basierender Effekt entscheidend für ein zukünftiges Nebenwirkungsprofil.

Zusammenfassung

Die wichtige Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFκB (*Nuclear Faktor-kappaB*) bei der Immunabwehr sowie bei Entzündungen und Infektionen ist bereits seit langem bekannt. Auch in Tumoren wurde eine hohe NFκB-Aktivität beobachtet und eine Beteiligung von NFκB an der molekularen Onkogenese dieser Tumoren kausal nachgewiesen. Studien haben bisher gezeigt, dass NFκB in einigen Zelllinien des malignen Melanoms dauerhaft aktiviert ist, die funktionelle Bedeutung von NFκB beim malignen Melanom ist jedoch nicht bekannt. Im Rahmen dieser Dissertation sollte neben der Charakterisierung der NFκB-Aktivierung in einer Reihe von Melanomzelllinien aus Tumoren unterschiedlicher Progressionsstadien, ein Beitrag zur funktionellen Bedeutung beim malignen Melanom erbracht werden.

Mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) konnte gezeigt werden, dass NFκB in Melanomzellen unterschiedlicher Progressionsstadien gegenüber normalen humanen Melanozyten aber auch gegenüber Melanomzellen radialer Wachstumsphase vermehrt aktiviert war. In weiteren Analysen mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wurden die NFκB-Untereinheiten p50 und p65 untersucht. Die p65-Untereinheit wies insbesondere in invasiven Zelllinien im Vergleich zu humanen Melanozyten und Melanomzellen radialer Wachstumsphase eine vermehrte Bindungsaktivität auf. Demgegenüber bestand bezüglich der Bindungsaktivität der p50-Untereinheit zwischen Melanomzellen und Melanozyten kein Unterschied.

Für funktionelle Analysen wurden NFκB-Inhibitionsstudien durchgeführt. Diese erfolgten mittels transienter Transfektion der Melanomzellen mit kurzen doppelsträngigen Oligonukleotiden, welche entweder durch direkte Bindung an den Transkriptionsfaktor (Decoy-Oligonukleotide) oder durch Bindung sowie Degradation seiner mRNA (siRNA, *small interfering RNA*) NFκB hemmen sollten.

Während eine Inhibition von NFκB über Decoy-Oligonukleotide nicht erfolgreich war, wurde mittels RNA-Interferenz über eine für p65-Untereinheit spezifische siRNA, eine effiziente Hemmung auf mRNA-Ebene festgestellt. Die Verringerung des p65-Proteins zeigte sich nach 3 Tagen deutlich und nahm nach 6 Tagen weiter zu. Es konnte mit dieser Technik eine nahezu vollständige Hemmung von NFκB-Zielgenen wie IL-8 und IL-1β nachgewiesen werden, was darauf hinwies, dass NFκB ein wichtiger Regulator dieser Gene beim malignen Melanom ist.

Weitere Studien von verschiedenen Melanomzellen (WM239A, 1205Lu und WM35) ergaben weder eine veränderte Proliferationsrate noch eine vermehrte Apoptoserate bei Hemmung von p65. Allerdings zeigten Invasionsuntersuchungen mittels eines

Matrigel-Assays, dass p65-inhibierte Melanomzellen eine deutlich reduzierte Invasion gegenüber den Kontrollen aufwiesen. Diese Daten legten nahe, dass NFκB eine wichtige Rolle bei der Invasion des malignen Melanoms spielt. Daher könnte NFκB einen neuen Angriffspunkt für die Therapie von fortgeschrittenen malignen Melanomen darstellen.

Literaturverzeichnis

1. Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R, Hauschild A: Short German guidelines: malignant melanoma, J Dtsch Dermatol Ges 2008, 6 Suppl 1:S9-S14
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002, CA Cancer J Clin 2005, 55:74-108
3. Krebs in Deutschland. 6. überarbeitete aA: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in der Deutschland e.V. und das RKI; Saarbrücken 2008
4. Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete aAG, RKI. deKidDeVud, Saarbrücken: 2006, 48-52
5. Berking C: [The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma], Hautarzt 2005, 56:687-696; quiz 697
6. Balch C, Houghton A, Sober A, Soong S: Cutaneous melanoma (Fourth Edition), Quality Medical Publishing, Inc., St. Louis, Missouri 2003
7. Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, Hayward N: CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma, J Natl Cancer Inst 1999, 91:446-452
8. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G: Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma, Oncogene 2003, 22:3099-3112
9. Polsky D, Cordon-Cardo C: Oncogenes in melanoma, Oncogene 2003, 22:3087-3091
10. Perlis C, Herlyn M: Recent advances in melanoma biology, Oncologist 2004, 9:182-187
11. Kwong L, Chin L, Wagner SN: Growth factors and oncogenes as targets in melanoma: lost in translation?, Adv Dermatol 2007, 23:99-129
12. Garbe C HA: Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom. In: Garbe C (Hrsg.) Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag 2005
13. Katzer K, Berking C: Das akrolentiginöse maligne Melanom: -Eine besondere Herausforderung - Fuß & Sprunggelenk 2008, Volume 6, 141-151
14. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC: The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin, Cancer Res 1969, 29:705-727
15. Roesch A, Landthaler M, Vogt T: [The dysplastic nevus. Separate entity, melanoma precursor or diagnostic dilemma?], Hautarzt 2003, 54:871-883; quiz 884-875
16. Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu MY, Schitteck B, Garbe C, Herlyn M: Molecular events in melanoma development and progression, Front Biosci 1998, 3:D1005-1010
17. Breslow A: Prognostic factors in the treatment of cutaneous melanoma, J Cutan Pathol 1979, 6:208-212
18. American Joint Committee on Cancer; Cancer staging manual, 6th Edition, Greene, FL 2002
19. Kalialis LV, Drzewiecki KT, Mohammadi M, Mehlsen AB, Klyver H: Spontaneous regression of metastases from malignant melanoma: a case report, Melanoma Res 2008, 18:279-283
20. Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, Perez-Gomez B, Sanchez L, Acuna MJ, Pajares R, Martinez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodriguez-Peralto JL: Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study, Am J Pathol 2004, 164:193-203

21. Miller AJ, Mihm MC, Jr.: Melanoma, *N Engl J Med* 2006, 355:51-65
22. Borner C, Schlagbauer Wadl H, Fellay I, Selzer E, Polterauer P, Jansen B: Mutated N-ras upregulates Bcl-2 in human melanoma in vitro and in SCID mice, *Melanoma Res* 1999, 9:347-350
23. Kumar R, Angelini S, Hemminki K: Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9, *Oncogene* 2003, 22:9217-9224
24. Tsao H, Mihm MC, Jr., Sheehan C: PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma, *J Am Acad Dermatol* 2003, 49:865-872
25. Papp T, Pemsel H, Rollwitz I, Schipper H, Weiss DG, Schiffmann D, Zimmermann R: Mutational analysis of N-ras, p53, CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDK4, and MC1R genes in human dysplastic melanocytic naevi, *J Med Genet* 2003, 40:E14
26. Hunter T: Oncoprotein networks, *Cell* 1997, 88:333-346
27. Giehl KA, Nagele U, Volkenandt M, Berking C: Protein expression of melanocyte growth factors (bFGF, SCF) and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma, *J Cutan Pathol* 2007, 34:7-14
28. Herlyn M: Human melanoma: development and progression, *Cancer Metastasis Rev* 1990, 9:101-112
29. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A: Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma, *Cytokine* 2000, 12:547-554
30. Kakinuma T, Hwang ST: Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis, *J Leukoc Biol* 2006, 79:639-651
31. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC: CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin, *J Exp Med* 2001, 194:1541-1547
32. Zlotnik A: Chemokines in neoplastic progression, *Semin Cancer Biol* 2004, 14:181-185
33. Vicari AP, Caux C: Chemokines in cancer, *Cytokine Growth Factor Rev* 2002, 13:143-154
34. Murakami T, Cardones AR, Hwang ST: Chemokine receptors and melanoma metastasis, *J Dermatol Sci* 2004, 36:71-78
35. Balentien E, Mufson BE, Shattuck RL, Derynck R, Richmond A: Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation, *Oncogene* 1991, 6:1115-1124
36. Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N, Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A: The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma, *J Leukoc Biol* 2000, 67:53-62
37. Murakami T, Cardones AR, Finkelstein SE, Restifo NP, Klaunberg BA, Nestle FO, Castillo SS, Dennis PA, Hwang ST: Immune evasion by murine melanoma mediated through CC chemokine receptor-10, *J Exp Med* 2003, 198:1337-1347
38. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA: Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis, *Eur J Cancer* 2006, 42:768-778
39. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ: Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84:9233-9237
40. Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, Marks RM: Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta, *Science* 1989, 243:1467-1469

41. Singh RK, Varney ML, Bucana CD, Johansson SL: Expression of interleukin-8 in primary and metastatic malignant melanoma of the skin, *Melanoma Res* 1999, 9:383-387
42. Bar-Eli M: Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma, *Pathobiology* 1999, 67:12-18
43. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M: Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis, *Am J Pathol* 1997, 151:1105-1113
44. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, Gudas JM, Bar-Eli M: Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma, *Am J Pathol* 2002, 161:125-134
45. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM: IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor, *J Immunol* 1993, 151:2667-2675
46. Wang JM, Taraboletti G, Matsushima K, Van Damme J, Mantovani A: Induction of haptotactic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/interleukin-8, *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 169:165-170
47. Westphal JR, Van't Hullenaar R, Peek R, Willems RW, Crickard K, Crickard U, Askaa J, Clemmensen I, Ruiter DJ, De Waal RM: Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo, *Int J Cancer* 2000, 86:768-776
48. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ: Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice, *Cancer Res* 1994, 54:3242-3247
49. Leslie MC, Bar-Eli M: Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment, *J Cell Biochem* 2005, 94:25-38
50. Strieter RM: Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 283:L688-689
51. Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nat Rev Cancer* 2002, 2:161-174
52. Davis GE, Pintar Allen KA, Salazar R, Maxwell SA: Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices, *J Cell Sci* 2001, 114:917-930
53. Bianchini F, D'Alessio S, Fibbi G, Del Rosso M, Calorini L: Cytokine-dependent invasiveness in B16 murine melanoma cells: role of uPA system and MMP-9, *Oncol Rep* 2006, 15:709-714
54. Cicek M, Fukuyama R, Cicek MS, Sizemore S, Welch DR, Sizemore N, Casey G: BRMS1 contributes to the negative regulation of uPA gene expression through recruitment of HDAC1 to the NF-kappaB binding site of the uPA promoter, *Clin Exp Metastasis* 2009, 26:229-237
55. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ: Matrix metalloproteinases in human melanoma, *J Invest Dermatol* 2000, 115:337-344
56. Wandel E, Grasshoff A, Mittag M, Hausteiner UF, Saalbach A: Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro, *Exp Dermatol* 2000, 9:34-41
57. Bianchini F, Massi D, Marconi C, Franchi A, Baroni G, Santucci M, Mannini A, Mugnai G, Calorini L: Expression of cyclo-oxygenase-2 in macrophages associated with cutaneous melanoma at different stages of progression, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007, 83:320-328
58. Vaisanen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T: Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma, *J Pathol* 1998, 186:51-58

59. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC: Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B, *FEBS Lett* 1998, 435:29-34
60. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK: Integrin signaling in malignant melanoma, *Cancer Metastasis Rev* 2005, 24:195-222
61. Eliceiri BP: Integrin and growth factor receptor crosstalk, *Circ Res* 2001, 89:1104-1110
62. Melnikova VO, Bar-Eli M: Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8, *Pigment Cell Res* 2006, 19:395-405
63. Lehmann JM, Riethmuller G, Johnson JP: MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86:9891-9895
64. Kraus A, Masat L, Johnson JP: Analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 and MUC18 on benign and malignant melanocytic lesions using monoclonal antibodies directed against distinct epitopes and recognizing denatured, non-glycosylated antigen, *Melanoma Res* 1997, 7 Suppl 2:S75-81
65. Mills L, Tellez C, Huang S, Baker C, McCarty M, Green L, Gudas JM, Feng X, Bar-Eli M: Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma, *Cancer Res* 2002, 62:5106-5114
66. Xie S, Luca M, Huang S, Gutman M, Reich R, Johnson JP, Bar-Eli M: Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis, *Cancer Res* 1997, 57:2295-2303
67. Satyamoorthy K, Muylers J, Meier F, Patel D, Herlyn M: Mel-CAM-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication, *Oncogene* 2001, 20:4676-4684
68. Li G, Herlyn M: Dynamics of intercellular communication during melanoma development, *Mol Med Today* 2000, 6:163-169
69. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M: Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma, *Pigment Cell Res* 2005, 18:150-159
70. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH: Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway, *Mol Biol Cell* 2005, 16:4386-4397
71. Takata M, Goto Y, Ichii N, Yamaura M, Murata H, Koga H, Fujimoto A, Saida T: Constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in acral melanomas, *J Invest Dermatol* 2005, 125:318-322
72. Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Palmer AA, Zhang XD, Thompson JF, Bron LP, Hersey P: Activation of the extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway in human melanoma, *J Clin Pathol* 2005, 58:1163-1169
73. Kumar R, Angelini S, Snellman E, Hemminki K: BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi, *J Invest Dermatol* 2004, 122:342-348
74. Wellbrock C, Marais R: Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation, *J Cell Biol* 2005, 170:703-708
75. Liu J, Suresh Kumar KG, Yu D, Molton SA, McMahon M, Herlyn M, Thomas-Tikhonenko A, Fuchs SY: Oncogenic BRAF regulates beta-Trcp expression and NF-kappaB activity in human melanoma cells, *Oncogene* 2007, 26:1954-1958
76. Bhatt KV, Spofford LS, Aram G, McMullen M, Pumiglia K, Aplin AE: Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling, *Oncogene* 2005, 24:3459-3471
77. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS: BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi, *Nature* 2005, 436:720-724

78. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS: High frequency of BRAF mutations in nevi, *Nat Genet* 2003, 33:19-20
79. Tong Q, Zheng L, Lin L, Li B, Wang D, Huang C, Li D: VEGF is upregulated by hypoxia-induced mitogenic factor via the PI-3K/Akt-NF-kappaB signaling pathway, *Respir Res* 2006, 7:37
80. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP: Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma, *Cancer Res* 2003, 63:2881-2890
81. Melnikova VO, Bar-Eli M: Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype, *Cancer Biol Ther* 2008, 7:997-1003
82. Jean D, Harbison M, McConkey DJ, Ronai Z, Bar-Eli M: CREB and its associated proteins act as survival factors for human melanoma cells, *J Biol Chem* 1998, 273:24884-24890
83. Yang S, McNulty S, Meyskens FL, Jr.: During human melanoma progression AP-1 binding pairs are altered with loss of c-Jun in vitro, *Pigment Cell Res* 2004, 17:74-83
84. Bar-Eli M: Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor, *Pigment Cell Res* 2001, 14:78-85
85. Murakami T, Toda S, Fujimoto M, Ohtsuki M, Byers HR, Etoh T, Nakagawa H: Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential, *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 288:8-15
86. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR, Fisher DE: Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability, *Cell* 2002, 109:707-718
87. Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H: Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth, *Oncogene* 2002, 21:7001-7010
88. Sen R, Baltimore D: Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism, *Cell* 1986, 47:921-928
89. Pahl HL, Baeuerle PA: The ER-overload response: activation of NF-kappa B, *Trends Biochem Sci* 1997, 22:63-67
90. Hayden MS, Ghosh S: Signaling to NF-kappaB, *Genes Dev* 2004, 18:2195-2224
91. Baldwin AS, Jr.: The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights, *Annu Rev Immunol* 1996, 14:649-683
92. Dixit V, Mak TW: NF-kappaB signaling. Many roads lead to madrid, *Cell* 2002, 111:615-619
93. Ghosh S, Karin M: Missing pieces in the NF-kappaB puzzle, *Cell* 2002, 109 Suppl:S81-96
94. Ueda Y, Richmond A: NF-kappaB activation in melanoma, *Pigment Cell Res* 2006, 19:112-124
95. Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF-kappa B in the immune system, *Annu Rev Immunol* 1994, 12:141-179
96. Silverman N, Maniatis T: NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity, *Genes Dev* 2001, 15:2321-2342
97. O'Shea JM, Perkins ND: Regulation of the RelA (p65) transactivation domain, *Biochem Soc Trans* 2008, 36:603-608
98. Amiri KI, Richmond A: Role of nuclear factor-kappa B in melanoma, *Cancer Metastasis Rev* 2005, 24:301-313
99. Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene* 1999, 18:6853-6866

100. Sheppard KA, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T: Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators, *Mol Cell Biol* 1999, 19:6367-6378
101. Messer G, Rupec RA: [Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). I. Function and regulation], *Hautarzt* 2001, 52:677-685
102. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB: Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside, *Exp Biol Med (Maywood)* 2008, 233:21-31
103. Ahn KS, Aggarwal BB: Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals, *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1056:218-233
104. Bonizzi G, Karin M: The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends Immunol* 2004, 25:280-288
105. Courtois G, Israel A: NF-kappa B defects in humans: the NEMO/incontinentia pigmenti connection, *Sci STKE* 2000, 2000:PE1
106. Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS, Jr.: Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation, *Mol Cell Biol* 1993, 13:3301-3310
107. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC: NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway, *Science* 1993, 259:1912-1915
108. Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C: Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm, *J Cell Sci* 1997, 110 (Pt 3):369-378
109. Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR: Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B, *J Biol Chem* 2002, 277:3863-3869
110. Bacher S, Schmitz ML: The NF-kappaB pathway as a potential target for autoimmune disease therapy, *Curr Pharm Des* 2004, 10:2827-2837
111. Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G: IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells, *J Biol Chem* 2001, 276:45225-45235
112. Scheidereit C: IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription, *Oncogene* 2006, 25:6685-6705
113. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC: NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100, *Mol Cell* 2001, 7:401-409
114. Perkins ND: Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway, *Oncogene* 2006, 25:6717-6730
115. Beinke S, Belich MP, Ley SC: The death domain of NF-kappa B1 p105 is essential for signal-induced p105 proteolysis, *J Biol Chem* 2002, 277:24162-24168
116. Baeuerle PA: IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control, *Cell* 1998, 95:729-731
117. Messer G, Rupec RA: [Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). II. Pathophysiologic meaning], *Hautarzt* 2001, 52:746-752; quiz 753-745
118. Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R: Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts, *Oncogene* 1999, 18:6888-6895
119. Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossmann M: The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation, *Curr Opin Immunol* 1998, 10:353-359
120. Perkins ND: The Rel/NF-kappa B family: friend and foe, *Trends Biochem Sci* 2000, 25:434-440
121. Tak PP, Firestein GS: NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases, *J Clin Invest* 2001, 107:7-11

122. Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA, Strasser A, Miyake K, Sha W, Gerondakis S: B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells, *J Exp Med* 1998, 187:663-674
123. Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D: Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells, *Nature* 1995, 373:531-536
124. Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, Gerondakis S: Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression, *Genes Dev* 1995, 9:1965-1977
125. Grigoriadis G, Zhan Y, Grumont RJ, Metcalf D, Handman E, Cheers C, Gerondakis S: The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations, *Embo J* 1996, 15:7099-7107
126. Franzoso G, Carlson L, Poljak L, Shores EW, Epstein S, Leonardi A, Grinberg A, Tran T, Scharton-Kersten T, Anver M, Love P, Brown K, Siebenlist U: Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture, *J Exp Med* 1998, 187:147-159
127. Akira S, Kishimoto T: NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation, *Adv Immunol* 1997, 65:1-46
128. Vincenti MP, Coon CI, Brinckerhoff CE: Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum* 1998, 41:1987-1994
129. Nichols TC, Fischer TH, Deliargyris EN, Baldwin AS, Jr.: Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis, *Ann Periodontol* 2001, 6:20-29
130. Chen CC, Rosenbloom CL, Anderson DC, Manning AM: Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation, *J Immunol* 1995, 155:3538-3545
131. Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS: AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis, *Autoimmunity* 1998, 28:197-208
132. Monaco C, Paleolog E: Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis, *Cardiovasc Res* 2004, 61:671-682
133. Bonetti B, Stegagno C, Cannella B, Rizzuto N, Moretto G, Raine CS: Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology, *Am J Pathol* 1999, 155:1433-1438
134. Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF: Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma, *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158:1585-1592
135. Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, Pettersson S, Arnold K, Muller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C, Buschenfelde KH: Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease, *Ann N Y Acad Sci* 1998, 859:149-159
136. van Den Brink GR, ten Kate FJ, Ponsioen CY, Rive MM, Tytgat GN, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP: Expression and activation of NF-kappa B in the antrum of the human stomach, *J Immunol* 2000, 164:3353-3359
137. Aupperle KR, Bennett BL, Boyle DL, Tak PP, Manning AM, Firestein GS: NF-kappa B regulation by I kappa B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes, *J Immunol* 1999, 163:427-433
138. Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T: Activation of transcription factor NF-kappa B in experimental glomerulonephritis in rats, *Biochim Biophys Acta* 1996, 1316:132-138

139. Yang F, de Villiers WJ, Lee EY, McClain CJ, Varilek GW: Increased nuclear factor-kappaB activation in colitis of interleukin-2-deficient mice, *J Lab Clin Med* 1999, 134:378-385
140. Donovan CE, Mark DA, He HZ, Liou HC, Kobzik L, Wang Y, De Sanctis GT, Perkins DL, Finn PW: NF-kappa B/Rel transcription factors: c-Rel promotes airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation, *J Immunol* 1999, 163:6827-6833
141. Balkwill F, Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow?, *Lancet* 2001, 357:539-545
142. Coussens LM, Werb Z: Inflammation and cancer, *Nature* 2002, 420:860-867
143. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D: Infections as a major preventable cause of human cancer, *J Intern Med* 2000, 248:171-183
144. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R: Primary liver cancer: worldwide incidence and trends, *Gastroenterology* 2004, 127:S5-S16
145. Roder DM: The epidemiology of gastric cancer, *Gastric Cancer* 2002, 5 Suppl 1:5-11
146. Ekblom A: Risk of cancer in ulcerative colitis, *J Gastrointest Surg* 1998, 2:312-313
147. Ernst PB, Gold BD: The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer, *Annu Rev Microbiol* 2000, 54:615-640
148. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer, *Cell* 2000, 100:57-70
149. Karin M, Greten FR: NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression, *Nat Rev Immunol* 2005, 5:749-759
150. Li Q, Withoff S, Verma IM: Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin, *Trends Immunol* 2005, 26:318-325
151. Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheidereit C: Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells, *Leukemia* 2000, 14:399-402
152. Rath PC: Relationship between constitutive nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and inhibitor kappaB-alpha (IkappaB-alpha) in an interferon-alpha-sensitive human Burkitt lymphoma cell line, *Biochim Biophys Acta* 2005, 1741:253-263
153. Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM, 3rd, Mackay S: Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer, *Surgery* 2001, 130:363-369
154. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B: Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells, *J Clin Invest* 1997, 100:2961-2969
155. Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin AS, Jr.: Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3, *Oncogene* 2000, 19:1123-1131
156. Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB: Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma, *Biochem Pharmacol* 2005, 70:700-713
157. Feinman R, Siegel DS, Berenson J: Regulation of NF-kB in multiple myeloma: therapeutic implications, *Clin Adv Hematol Oncol* 2004, 2:162-166
158. Baby J, Pickering BF, Vashisht Gopal YN, Van Dyke MW: Constitutive and inducible nuclear factor-kappaB in immortalized normal human bronchial epithelial and non-small cell lung cancer cell lines, *Cancer Lett* 2007, 255:85-94
159. Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V: Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells, *Oncogene* 1999, 18:2567-2577

160. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ: The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells, *Clin Cancer Res* 1999, 5:119-127
161. Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, Amenta PS, Zong WX, Gelinas C, Rabson AB: Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells, *Prostate* 2002, 52:183-200
162. Visconti R, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, Zeki K, Miano MP, de Nigris F, Casalino L, Curcio F, Santoro M, Fusco A: Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression, *Oncogene* 1997, 15:1987-1994
163. Gilmore TD: Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel, *Oncogene* 1999, 18:6925-6937
164. Xiao G, Cvijic ME, Fong A, Harhaj EW, Uhlik MT, Waterfield M, Sun SC: Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha, *Embo J* 2001, 20:6805-6815
165. Mosialos G: The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription, *Semin Cancer Biol* 1997, 8:121-129
166. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW: NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit, *Nat Rev Cancer* 2002, 2:301-310
167. Karin M: Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression, *Nature* 2006, 441:431-436
168. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J: NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP, *Mol Cell Biol* 2001, 21:5299-5305
169. Karin M, Lin A: NF-kappaB at the crossroads of life and death, *Nat Immunol* 2002, 3:221-227
170. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr.: NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science* 1998, 281:1680-1683
171. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr.: NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1, *Mol Cell Biol* 1999, 19:5785-5799
172. Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S: Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells, *J Biol Chem* 1995, 270:31315-31320
173. Habib AA, Chatterjee S, Park SK, Ratan RR, Lefebvre S, Vartanian T: The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase to activate NF-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome, *J Biol Chem* 2001, 276:8865-8874
174. Novak U, Cocks BG, Hamilton JA: A labile repressor acts through the NFkB-like binding sites of the human urokinase gene, *Nucleic Acids Res* 1991, 19:3389-3393
175. Sottile J: Regulation of angiogenesis by extracellular matrix, *Biochim Biophys Acta* 2004, 1654:13-22
176. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G: Inflammation and cancer: how hot is the link?, *Biochem Pharmacol* 2006, 72:1605-1621
177. Yu HG, Yu LL, Yang Y, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F: Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis, *Oncology* 2003, 65:37-45
178. Pollet I, Opina CJ, Zimmerman C, Leong KG, Wong F, Karsan A: Bacterial lipopolysaccharide directly induces angiogenesis through TRAF6-mediated activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase, *Blood* 2003, 102:1740-1742
179. Huang WC, Chan ST, Yang TL, Tzeng CC, Chen CC: Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK

- complex: molecular and functional study of novel alpha-methylene-gamma-butyrolactone derivatives, *Carcinogenesis* 2004, 25:1925-1934
180. Knippers R: *Molekulare Genetik.*, Thieme, Stuttgart, New York 1995
181. Wittwer CT, Garling DJ: Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization, *Biotechniques* 1991, 10:76-83
182. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control, *Biotechniques* 1997, 22:176-181
183. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE: Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85:8790-8794
184. Wang K, Tang Z, Yang CJ, Kim Y, Fang X, Li W, Wu Y, Medley CD, Cao Z, Li J, Colon P, Lin H, Tan W: Molecular engineering of DNA: molecular beacons, *Angew Chem Int Ed Engl* 2009, 48:856-870
185. Yang J, Richmond A: Constitutive I κ B kinase activity correlates with nuclear factor- κ B activation in human melanoma cells, *Cancer Res* 2001, 61:4901-4909
186. Plaksin D, Baeuerle PA, Eisenbach L: KBF1 (p50 NF- κ B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells, *J Exp Med* 1993, 177:1651-1662
187. Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang LQ, Nabel GJ: Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides, *Science* 1990, 250:997-1000
188. Morishita R, Tomita N, Kaneda Y, Ogihara T: Molecular therapy to inhibit NF κ B activation by transcription factor decoy oligonucleotides, *Curr Opin Pharmacol* 2004, 4:139-146
189. Kurreck J: RNA interference: from basic research to therapeutic applications, *Angew Chem Int Ed Engl* 2009, 48:1378-1398
190. Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K: Cooperative interaction of nuclear factor- κ B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines, *J Biol Chem* 1990, 265:21128-21133
191. Tomita N, Morishita R, Tomita S, Gibbons GH, Zhang L, Horiuchi M, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T, Dzau VJ: Transcription factor decoy for NF κ B inhibits TNF- α -induced cytokine and adhesion molecule expression in vivo, *Gene Ther* 2000, 7:1326-1332
192. Tomita N, Morishita R, Lan HY, Yamamoto K, Hashizume M, Notake M, Toyosawa K, Fujitani B, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T: In vivo administration of a nuclear transcription factor- κ B decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis, *J Am Soc Nephrol* 2000, 11:1244-1252
193. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M: Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death, *Cell* 1996, 87:565-576
194. Beg AA, Baltimore D: An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death, *Science* 1996, 274:782-784
195. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr.: TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B, *Science* 1996, 274:784-787
196. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M: NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition, *Mol Cell Biol* 1999, 19:2690-2698
197. Kuwada Y, Sasaki T, Morinaka K, Kitadai Y, Mukaida N, Chayama K: Potential involvement of IL-8 and its receptors in the invasiveness of pancreatic cancer cells, *Int J Oncol* 2003, 22:765-771

198. Reiland J, Furcht LT, McCarthy JB: CXC-chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the CXCR2 receptor, *Prostate* 1999, 41:78-88
199. Haraguchi M, Komuta K, Akashi A, Matsuzaki S, Furui J, Kanematsu T: Elevated IL-8 levels in the drainage vein of resectable Dukes' C colorectal cancer indicate high risk for developing hepatic metastasis, *Oncol Rep* 2002, 9:159-165
200. Bendre MS, Gaddy-Kurten D, Mon-Foote T, Akel NS, Skinner RA, Nicholas RW, Suva LJ: Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo, *Cancer Res* 2002, 62:5571-5579
201. Shattuck-Brandt RL, Richmond A: Enhanced degradation of I-kappaB alpha contributes to endogenous activation of NF-kappaB in Hs294T melanoma cells, *Cancer Res* 1997, 57:3032-3039
202. Meyskens FL, Jr., Buckmeier JA, McNulty SE, Tohidian NB: Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanomacells and the effect of oxidative stress, *Clin Cancer Res* 1999, 5:1197-1202
203. Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ: Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice, *Clin Cancer Res* 2000, 6:2573-2581
204. Shattuck RL, Wood LD, Jaffe GJ, Richmond A: MGSA/GRO transcription is differentially regulated in normal retinal pigment epithelial and melanoma cells, *Mol Cell Biol* 1994, 14:791-802
205. McNulty SE, Tohidian NB, Meyskens FL, Jr.: RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B, *Pigment Cell Res* 2001, 14:456-465
206. Al-Zoubi AM, Efimova EV, Kaithamana S, Martinez O, El-Idrissi Mel A, Dogan RE, Prabhakar BS: Contrasting effects of IG20 and its splice isoforms, MADD and DENN-SV, on tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis and activation of caspase-8 and -3, *J Biol Chem* 2001, 276:47202-47211
207. Portis T, Harding JC, Ratner L: The contribution of NF-kappa B activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors, *Blood* 2001, 98:1200-1208
208. Sorokina EM, Merlo JJ, Jr., Tsygankov AY: Molecular mechanisms of the effect of herpesvirus saimiri protein StpC on the signaling pathway leading to NF-kappaB activation, *J Biol Chem* 2004, 279:13469-13477
209. Tomita N, Morishita R, Tomita S, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T, Horiuchi M: Inhibition of TNF-alpha, induced cytokine and adhesion molecule. Expression in glomerular cells in vitro and in vivo by transcription factor decoy for NFkappaB, *Exp Nephrol* 2001, 9:181-190
210. Tomita T, Takeuchi E, Tomita N, Morishita R, Kaneko M, Yamamoto K, Nakase T, Seki H, Kato K, Kaneda Y, Ochi T: Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy, *Arthritis Rheum* 1999, 42:2532-2542
211. Dajee M, Muchamuel T, Schryver B, Oo A, Alleman-Sposeto J, De Vry CG, Prasad S, Ruhmund D, Shyamsundar R, Mutnick D, Mai K, Le T, Parham C, Zhang J, Komuves L, Colby T, Hudak S, McEvoy LM, Ehrhardt RO: Blockade of experimental atopic dermatitis via topical NF-kappaB decoy oligonucleotide, *J Invest Dermatol* 2006, 126:1792-1803
212. Sawa Y, Morishita R, Suzuki K, Kagisaki K, Kaneda Y, Maeda K, Kadoba K, Matsuda H: A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element 'decoy' against NFkappaB binding site: evidence for a role of NFkappaB in ischemia-reperfusion injury, *Circulation* 1997, 96:II-280-284; discussion II-285

213. Suzuki Y, Nishida Y, Naruse T, Gemba T, Ishiguro N: Pericellular Matrix Formation Alters the Efficiency of Intracellular Uptake of Oligonucleotides in Osteosarcoma Cells, *J Surg Res* 2008
214. Guo J, Verma UN, Gaynor RB, Frenkel EP, Becerra CR: Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated down-regulation of the nuclear factor-kappaB p65 subunit, *Clin Cancer Res* 2004, 10:3333-3341
215. Pan X, Arumugam T, Yamamoto T, Levin PA, Ramachandran V, Ji B, Lopez-Berestein G, Vivas-Mejia PE, Sood AK, McConkey DJ, Logsdon CD: Nuclear factor-kappaB p65/relA silencing induces apoptosis and increases gemcitabine effectiveness in a subset of pancreatic cancer cells, *Clin Cancer Res* 2008, 14:8143-8151
216. Singh RK, Gutman M, Reich R, Bar-Eli M: Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8, *Cancer Res* 1995, 55:3669-3674
217. Kunsch C, Rosen CA: NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter, *Mol Cell Biol* 1993, 13:6137-6146
218. Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ: Level of interleukin-8 expression by metastatic human melanoma cells directly correlates with constitutive NF-kappaB activity, *Cytokines Cell Mol Ther* 2000, 6:9-17
219. Chen X, Kandasamy K, Srivastava RK: Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling, *Cancer Res* 2003, 63:1059-1066
220. Yang J, Amiri KI, Burke JR, Schmid JA, Richmond A: BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways, *Clin Cancer Res* 2006, 12:950-960
221. Schon M, Wienrich BG, Kneitz S, Sennefelder H, Amschler K, Vohringer V, Weber O, Stiewe T, Ziegelbauer K, Schon MP: KINK-1, a novel small-molecule inhibitor of IKKbeta, and the susceptibility of melanoma cells to antitumoral treatment, *J Natl Cancer Inst* 2008, 100:862-875
222. Oy GF, Slipicevic A, Davidson B, Solberg Faye R, Maelandsmo GM, Florenes VA: Biological effects induced by insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) in malignant melanoma, *Int J Cancer* 2010, 126:350-361
223. Kim A, Kim MJ, Yang Y, Kim JW, Yeom YI, Lim JS: Suppression of NF-{kappa}B activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells, *Carcinogenesis* 2009
224. Lin WM, Baker AC, Beroukhir R, Winckler W, Feng W, Marmion JM, Laine E, Greulich H, Tseng H, Gates C, Hodi FS, Dranoff G, Sellers WR, Thomas RK, Meyerson M, Golub TR, Dummer R, Herlyn M, Getz G, Garraway LA: Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma, *Cancer Res* 2008, 68:664-673
225. Berking C, Herlyn M: Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology, *Histol Histopathol* 2001, 16:669-674

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

A	Adenin
AJCC	<i>American Joint Comittee on Cancer</i>
ALM	Akrolentiginöses Melanom
AP-1	Aktivator protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BAD	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
BAFF	<i>B-cell activating factor of the TNF family</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
<i>bp</i>	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
CAMs	<i>Cellular adhesion molecules</i>
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CO	<i>Control oligonukleotide</i>
CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	<i>Counts per minute</i>
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro (1,2 dioxetane-2,2'-(5'-Chloro) Tricyclodecan)-4-yl) Phenylphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dFKS	Dialysiertes fötales Kälberserum
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle`s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Desoxyribonucleoside-triphosphate</i>
ds	<i>Double stranded</i>
DTT	Dithiothreitol
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>

EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EHS	Engelbrecht-Holm-Swarm
ELAM-1	<i>Endothelial leukocyte adhesion molecule-1</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ET	Eindringtiefe
ET-3	Endothelin-3
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Foetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G	Guanin
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i>
h	Stunde
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	HEPES 2,4(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl- Ethansulfonsäure
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HM	Humane Melanozyten
HPRT	Hypoxanthine-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSA	Humanes Serum-Albumin
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IAP 1/2	<i>Inhibitor of apoptosis protein 1/2</i>
ICAM-1	<i>Intercellular cell adhesion molecule-1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
I κ B	Inhibitor kappa-B
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
LNA	Locked nucleic acid
M	Mol
Mel-CAM/MUC 18	<i>Melanocytic cell adhesion molecule</i>
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrix-metalloproteinase
Min	Minute (n)
mRNA	Messenger-RNA
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
n.v.	Information nicht verfügbar
NEMO	<i>NFκB-essential-modifier</i>
NES	Nukleäre Exportsequenz
NFκB	Nukleärer Faktor-kappa B
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NM	Noduläres Melanom
OD	<i>Optical density</i>
ODN	Oligonukleotid/ Oligodesoxynukleotid
p	Passage
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PGE2	Prostaglandin E2
PET-Membran	<i>Polyethylene terephthalate membrane</i>
RHD	Rel homologie Domäne
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
PTO	Phosphorothioat
PVDF	Polyvinylidifluorid
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RNasin	<i>Ribonuclease inhibitor</i>
RGP	<i>Radial growth phase</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time-PCR</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
ss	<i>single stranded</i>
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
STS	Staurosporin
T	Thymin
TADs	Transkriptions aktivierende Domänen
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TD	Tumordicke
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TEMED	Tetramethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
7TM	7-transmembran
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
uPAR	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
Upm	Umdrehungen pro Minute
URGP	<i>Unclassified radial growth phases</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VGP	<i>Vertical growth phase</i>
WB	Western-Blot

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka bedanke ich mich für die Möglichkeit, an seinem Institut arbeiten zu dürfen.

Mein Dank gilt in besonderem Maße meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Carola Berking und meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn PD Dr. rer. hum. biol. Robert Besch für die interessante Themenstellung, die kontinuierliche und intensive Betreuung meiner Arbeit sowie die zahlreichen Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen. Meinem Betreuer danke ich im Speziellen für die Einführung in experimentelles Arbeiten im Labor und seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft. Darüber hinaus danke ich meiner Doktormutter für die finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglichte, einen internationalen Melanomkongress in Noordwijk, Niederlanden zu besuchen.

Bei Claudia Kammerbauer bedanke ich mich für die herzliche Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung.

Großer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir mein Studium und meine Promotion erst ermöglicht haben. Meinem Vater und meinem Freund danke ich ferner für die anregenden Diskussionen während des Verfassens meiner Arbeit.